



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
**Universidad del Perú. Decana de América**  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**Determinación de la resistencia microbiana de cepas de  
*Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos  
provenientes de mercados de Lima Metropolitana**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**AUTOR**

Robin Edinson LÓPEZ SÁNCHEZ

**ASESOR**

Mirtha ROQUE ALCARRAZ

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

López R. Determinación de la resistencia microbiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos provenientes de mercados de Lima Metropolitana [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2016.

---

1056



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
DECANATO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

12  
3 - 56

56

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**"DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA MICROBIANA DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE QUESOS FRESCOS PROVENIENTES DE MERCADOS DE LIMA METROPOLITANA"**

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

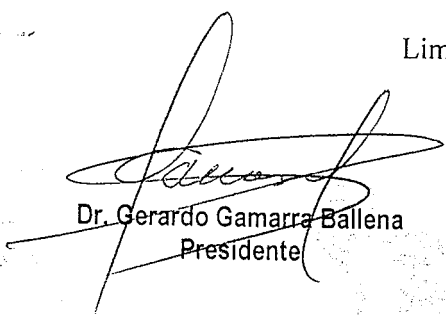
**ROBIN EDINSON LÓPEZ SÁNCHEZ**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación ha obtenido la siguiente calificación:


**SOBRESALIENTE DIECISIETE (17)**

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 02 de setiembre del 2016

  
Dr. Gerardo Gamarra Ballena  
Presidente

  
MG. Jesús Victoria Rumiche Briceño  
Miembro

  
Dra. María Elena Salazar Salvatierra  
Miembro

  
Q.F. Robert Dante Almonacid Román  
Miembro

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Av. Puno N° 1002, Jardín Botánico - Lima 1 - Perú  
Teléfono: (511) 328-4737 / 328-4739 Fax: (511) 619-7000 anexo 4819 - Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe - <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001

BUREAU VERITAS  
Certification

N° BR733266



## ***AGRADECIMIENTOS***

Un agradecimiento especial a la Mg. Mirtha Roque Alcarraz, docente por su orientación y experiencia profesional transmitida en la asesoría de esta tesis.

A los distinguidos Miembros del Jurado Examinador y Calificador:

Dr. Gerardo Gamarra Ballena,

Mg. Jesús Victoria Rumiche Briceño,

Dra. María Elena Salazar Salvatierra,

Q.F. Robert Dante Almonacid Román;

Por las sugerencias y recomendaciones en la revisión de la tesis.

A los docentes Julio Ruiz, Nelson Bautista y a las personas responsables del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM por su disposición y apoyo brindado para la ejecución de esta investigación.

## ***DEDICATORIA***

*A DIOS, por ser nuestro guía y por darme la perseverancia, sabiduría necesaria para seguir adelante.*

*A MIS PAPÁS Y HERMANOS, en especial a mi hermana Milagros, por ser el ángel que nos cuida desde el cielo, y a toda mi familia por estar siempre a mi lado en cada paso.*

# INDICE

## RESUMEN SUMMARY

### I. INTRODUCCIÓN

### II. OBJETIVOS

III. GENERALIDADES	3
3.1. Queso	3
3.1.1. Queso Fresco	3
3.2. Contaminación e higiene de los alimentos	4
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
3.3.1. Factores de Virulencia	6
3.3.2. Intoxicación Alimentaria por <i>Staphylococcus aureus</i>	7
3.4. Uso de Antibióticos en Veterinaria	8
3.4.1. Uso de Antibióticos en la Ganadería Lechera	8
3.4.2. Antibióticos de Uso Frecuente en el Ganado bovino	9
3.4.3. Mastitis en el Ganado Bovino	9
3.5. Resistencia a Antibióticos	11
3.5.1. Tipos de resistencia	12
3.6. Resistencia a antibióticos transmitida por los alimentos	13
3.7. Consecuencias de la resistencia a antibióticos transmitida por alimentos	14
3.8. Mecanismo de Resistencia a Antibióticos	14
3.8.1. Mecanismo de Resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a Antibióticos	14
3.9. Factores que Favorecen la Aparición y Propagación de la Resistencia	18
3.10. Consideraciones para la selección de los discos de sensibilidad antibiótica	19
IV. PARTE EXPERIMENTAL	20
4.1. Diseño	20
4.2. Materiales	20

4.3.	Tamaño de la muestra y plan de muestreo	20
4.4.	Transporte de muestras	20
4.5.	Lugar de ejecución	20
4.6.	Metodología de Trabajo	21
4.6.1.	Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
4.6.2.	Pruebas de Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
4.6.3.	Prueba de Sensibilidad por el Método de Difusión en Disco Kirby Bauer	23
V.	RESULTADOS	26
VI.	DISCUSIÓN	33
VII.	CONCLUSIONES	37
VIII.	RECOMENDACIONES	38
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
X.	ANEXOS	47



## Lista de Tablas

Tabla 1. Antibióticos más importantes y resistencia clínica.....	11
Tabla 2. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en UFC/g de queso fresco .....	28
Tabla 3. Pruebas de Identificación de cepas de <i>S. aureus</i> .....	29
Tabla 4. Perfil de Sensibilidad antimicrobiana de cepas de <i>S. aureus</i> coagulasa positivas .....	30
Tabla 5. Porcentaje de la susceptibilidad antibiótica de cepas de <i>S. aureus</i> coagulasa positivas .....	31
Tabla 6. Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> coagulasa positivas que presentan resistencia a antibióticos. ....	31
Tabla 7. Antibióticos y diámetros críticos para <i>Staphylococcus spp.</i> .....	50

## Lista de Figuras

Figura 1. Ejemplo de cómo se propaga la resistencia a antibióticos .....	13
Figura 2. Esquema para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en quesos frescos .....	25
Figura 3. Porcentaje de muestras de queso fresco positivas al aislamiento de <i>S. aureus</i> .....	27
Figura 4. Porcentaje de resultados positivos y negativos al aislamiento de <i>S. aureus</i> en quesos frescos según mercado de procedencia .....	27
Figura 5. Porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia de cepas de <i>S. aureus</i> coagulasa positivas.....	32

## **ABREVIATURAS**

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BHI: Infusión cerebro corazón

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios

CMI. Concentración inhibitoria mínima

DNasa: Desoxirribonucleasa

ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos

FDA: Agencia de Alimentos y Medicamentos

ICMSF: Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos

MH: Mueller Hinton

NTS: Norma Técnica Sanitaria

OMS: Organización Mundial de la Salud

TSB: Caldo tripticasa de soya

UFC: Unidades formadoras de colonias

## RESUMEN

La resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* a la mayoría de los antibióticos, plantea un problema de salud pública, por el riesgo de propagación de resistencias a través de alimentos. El objetivo de esta investigación es determinar la resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos que se expenden en mercados que presentan contaminación relacionada a diversos factores como las condiciones de higiene de los espacios de venta y/o manipuladores y la refrigeración inadecuada de este alimento. Para este propósito se recolectan 40 muestras de quesos frescos, procedentes de cuatro mercados de Lima Metropolitana: Mercado Central, La Parada, Caquetá y Valle Sagrado Huáscar. De cada mercado se toman 10 muestras, donde la unidad representativa es de 100g del alimento. Las muestras son analizadas según metodología del ICMSF, aislándose cepas de *S. aureus* que son identificadas bioquímicamente mediante pruebas como coagulasa, manitol salado, DNasa. Una vez identificadas, se evalúa la resistencia a los antibióticos mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Los resultados obtenidos en el estudio presentaron muestras contaminadas con la bacteria, con recuentos mayores a  $10^5$  UFC/g, de las cuales 31 cepas de *S. aureus* coagulasa positivas aisladas mostraron resistencia a penicilina (96,77%), oxacilina (77,42%), gentamicina (3,23%) y norfloxacino (3,23%). También mostraron sensibilidad a vancomicina (100%), gentamicina (96,77%) y norfloxacino (96,77%).

**Palabras clave:** Resistencia a antibióticos, *Staphylococcus aureus*, antibióticos en bovinos, queso.

## SUMMARY

The resistance of *Staphylococcus aureus* strains to most antibiotics poses a public health problem because of the risk of spread of resistance through food. The objective of this research is to determine the antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated from fresh cheeses sold in markets with pollution related to several factors: hygiene conditions of places and/or manipulators and inadequate cooling of this food. For this purpose, 40 samples of fresh cheeses are collected from four markets of Lima: Central Market, La Parada, Valle Sagrado Huascar and Caqueta. Each market is taken 10 samples, where representative unit is 100 g food. The samples are analyzed according to methodology ICMSF, then *S. aureus* strains are isolated and identified bioquimicamente by tests as coagulase, salty mannitol, DNase. Once identified, the antibiotic resistance is assessed by disk diffusion method of Kirby-Bauer. The results obtained in the study showed contaminated samples with bacteria, with higher counts to  $10^5$  CFU/g, from them 31 strains *S. aureus* coagulase positive isolated showed resistance to penicillin (96.77%), oxacillin (77.42%), gentamicin (3.23%) and norfloxacin (3.23%). Also showed sensitivity to vancomycin (100%), gentamicin (96.77%) and norfloxacin (96.77%).

**Keywords:** Antibiotic resistance, *Staphylococcus aureus*, antibiotic in cattle, cheese.

## I. INTRODUCCIÓN

El uso intensivo de antibióticos en los sistemas de producción animal y en Salud Pública, probablemente un factor desencadenante, desde hace muchos años ha conllevado una mayor resistencia a los antibióticos de cepas de *S. aureus*. En ese panorama, la resistencia a antibióticos es un problema de Salud Pública conocido en muchos países debido a la circulación de cepas resistentes en el medio ambiente y la posible contaminación de agua y alimentos. Ante esto, investigadores han postulado que eventualmente los microorganismos ingeridos diariamente con los alimentos podrían estar sirviendo como reservorios para el mantenimiento de la resistencia a los antibióticos<sup>1,2</sup>.

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, perteneciente a la microbiota de la piel y las membranas mucosas de los animales y seres humanos, de ahí que éstos últimos sean la fuente más frecuente de contaminación estafilocócica en los alimentos<sup>3, 4</sup>. Además puede adaptarse rápidamente a la presión selectiva de los antibióticos generando resistencia<sup>5</sup>.

La contaminación de alimentos por *S. aureus* puede ocurrir directamente desde los animales de consumo, los cuales pueden estar infectados, o puede resultar de la manipulación o manejo inadecuado de alimentos durante su procesado, almacenamiento o comercialización, que permiten el crecimiento del microorganismo y producción de sus enterotoxinas<sup>1,3</sup>.

El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas tiene especial interés dado la posibilidad de transferencia de los genes de resistencia a antimicrobianos entre los microorganismos de igual o diferente género y especie, y que, a su vez, pueden infectar al ser humano a través de la cadena alimentaria<sup>6</sup>. Por otro lado, permite evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos. Por lo expuesto se fijó como objetivo general el evaluar la resistencia a los antibióticos de cepas de *S. aureus* aisladas de quesos frescos que se expenden en los mercados de la ciudad de Lima Metropolitana, lo que supone un riesgo potencial de propagación de cepas resistentes al consumidor.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL:**

- Determinar la resistencia microbiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos provenientes de mercados de Lima Metropolitana.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivas presentes en quesos frescos.
- Determinar la resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivas frente a los antibióticos seleccionados por el método Kirby Bauer.
- Determinar la sensibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivas frente a los antibióticos seleccionados por el método Kirby Bauer.

### **III. GENERALIDADES**

#### **3.1. Queso**

Producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante:

- a. Coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche desnatada/descremada, leche parcialmente desnatada/descremada, nata (crema), nata (crema) de suero o leche de mantequilla/manteca, o de cualquier combinación de estos materiales, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación; y/o
- b. Técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado (a)<sup>7</sup>.

##### **3.1.1. Queso Fresco:**

Producto de leche pasteurizada, sin madurar, que está listo para el consumo poco después de su fabricación<sup>7</sup>. Es el producto sin madurar obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche cruda o reconstituida, pasteurizada, entera o parcialmente descremada, o de una mezcla de estos productos, y que cumple con los requisitos especificados en esa norma (generales: color, forma, corteza, pasta, composición; fisicoquímicos; aditivos alimentarios permitidos; microbiológicos; y temperatura de conservación)<sup>8</sup>.

Según la NTS N°118-MINSA/DIGESA-V.01, Perú 2015, el queso “fresco” pertenece al Grupo 2 de Alimentos de Alto Riesgo (AAR), alimento de origen animal con algún tratamiento tecnológico que requieren cadena de frío (refrigeración/congelación), que de no observarse estas condiciones podría causar una ETA<sup>9</sup>. La refrigeración del queso es muy importante, puesto que rupturas de la misma inducirán a la multiplicación de bacterias de riesgo:

*Brucella* y *Mycobacterium*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*<sup>10</sup>.

### 3.2. Contaminación e higiene de los alimentos

La contaminación microbiana de alimentos causa preocupación en muchos países, debido especialmente a los elevados índices de enfermedades vinculadas por consumo de alimentos crudos, mal preparados y mal conservados<sup>4</sup>.

El Codex Alimentarius señala que en alimentos como la leche y productos lácteos la higiene, manipulación, almacenamiento y transporte son de gran importancia y deben llevarse a cabo de forma que se evite su contaminación y se reduzca al mínimo la posibilidad de aumentar su carga microbiana<sup>11</sup>.

La higiene de los alimentos, son condiciones y medidas necesarias para garantizar la seguridad y salubridad de los productos alimentarios, incluida la manipulación por el consumidor desde el momento en que adquiere el alimento en un punto de venta hasta que lo prepara y consume. La seguridad alimentaria, por su parte, se logra mediante el adecuado control de calidad de la materia prima durante su procesamiento hasta obtener un producto manufacturado óptimo, pero también es crucial lograr condiciones adecuadas de almacenamiento, transporte y manipulación del producto final en los mercados donde se comercializa<sup>12</sup>.

Como forma de prevención de una ETA, se establece que cuando los alimentos se obtienen con una carga baja de estafilococos permanecerán libres de enterotoxinas y de otros peligros, si se mantienen debajo de 40°F (4,4°C) o por encima de 140°F (60°C) hasta el consumo<sup>13</sup>.

### 3.3. *Staphylococcus aureus*

De *Staphy*= racimo y *kokkos*=granos, son bacterias en forma de coco, Gram-positivas, no esporuladas, la presentación característica son sus agrupaciones irregulares semejantes a racimos de uvas. Son bacterias aerobias o anaerobias



facultativas, inmóviles, mesófilas, necesitan de aminoácidos y vitaminas para su crecimiento, son capaces de fermentar la glucosa y también el manitol, toleran condiciones ambientales muy variables: son osmotolerantes, resistiendo concentraciones hasta un 20% de NaCl, lo que le permite crecer en alimentos con baja actividad de agua (desde 0.99 hasta 0.83 aw). Son además resistentes a la desecación, congelación y el calor<sup>4,13</sup>.

El crecimiento de *S. aureus*, en general, oscila entre 7° a 48 °C (óptimo 37°C), el intervalo de pH de crecimiento está entre 4 y 9,3, con un óptimo entre 7,0 y 7,5<sup>13-15</sup>. *S. aureus* se aísla con frecuencia de la piel y mucosas del hombre y animales. En las personas el principal reservorio de *S. aureus* es la cavidad nasal, aunque también se aloja en la nasofaringe y con menor frecuencia en la faringe<sup>3,4</sup>.

*S. aureus* no compite bien con la microbiota de los alimentos crudos, la contaminación se asocia principalmente con el manejo inadecuado de los alimentos cocinados o procesados, seguido de bajas condiciones de almacenamiento<sup>3</sup>. Las dos fuentes de contaminación más importantes para los alimentos son los portadores nasales y las personas con ampollas y heridas infectadas en manos y brazos a los que se les permite manipular alimentos<sup>4,14</sup>.

La mayoría de los animales domésticos albergan *S. aureus*. La mastitis estafilocócica no resulta desconocida en los rebaños lecheros, y si se consume la leche de vacas infectadas o se utilizan en la fabricación de queso, la probabilidad de contraer ETA es muy alta<sup>3</sup>.

*S. aureus* se adapta con facilidad a las condiciones cambiantes del medio, por lo que puede generar resistencia a los antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones estafilocócicas, desarrollando múltiples mecanismos de resistencia, junto a este problema posee factores de virulencia que le permiten aumentar su capacidad de producir infecciones graves tanto en pacientes hospitalizados como en la comunidad<sup>5</sup>.

### 3.3.1. Factores de Virulencia

*Polisacáridos capsulares:* Algunas cepas de *S. aureus* producen exopolisacáridos que puede impedir la ingestión del microorganismo por las células polimorfonucleares. Este material puede promover la adherencia de los microorganismos a las células huésped<sup>16</sup>.

*Peptidoglucano y ácidos teicoicos:* Las paredes celulares contienen peptidoglucanos (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico con enlaces  $\beta$ 1, 4) y ácidos teicoicos, que son polímeros de fosfato de ribitol (monosacárido de 5 carbonos). Los ácidos teicoicos actúan en la adherencia específica de las bacterias Gram positivas a las superficies mucosas. Ambos componentes promueven la rigidez y elasticidad a la membrana celular estafilocócica<sup>16</sup>.

*Proteína A:* Se encuentra en la superficie celular. Interfiere en la opsonización e ingestión de los microorganismos llevada a cabo por los leucocitos polimorfonucleares, activa el complemento y provoca reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía<sup>16</sup>.

*Enzimas:*

- Catalasa, inactiva el peróxido de hidrógeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema de la mieloperoxidasa dentro de las células fagocíticas después de la ingestión de los microorganismos.
- Coagulasa, se une a la protrombina y la vuelve enzimáticamente activa, con lo que cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina. Esto puede cubrir a la bacteria con fibrina haciéndolas más resistentes a la opsonización y la fagocitosis.
- Fibrinolisin, hialuronidasa, lipasas, nucleasas,  $\beta$ -lactamasa. La principal función de estas proteínas es convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el crecimiento bacteriano<sup>16</sup>.

*Toxinas.*

*Hemolisinas (alfa, beta, delta y gamma).* Son exotoxinas proteicas que tienen efectos letales sobre una gran variedad de tipos celulares. La toxina alfa es la más

estudiada, tiene efecto sobre leucocitos polimorfonucleares y lisan eritrocitos de varias especies animales<sup>16</sup>.

Algunas cepas de *S. aureus* producen una o más exoproteínas adicionales, que incluyen a la toxina del síndrome del shock tóxico 1 (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas ([SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SES, SET], con actividad emética demostrada, y las enterotoxinas estafilocócicas similares [SE-like]: SEIJ-SEIU2, que no han sido confirmados su actividad emética), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB), y las leucocidinas. De cada una de estas toxinas se conoce que estimulan la respuesta del sistema inmune del huésped, pero además ellas tienen otros efectos biológicos<sup>3, 4, 16</sup>.

### **3.3.2. Intoxicación Alimentaria por *Staphylococcus aureus***

La intoxicación alimentaria estafilocócica resulta del consumo de alimentos que contienen una o más enterotoxinas preformadas<sup>2</sup>. Los alimentos involucrados contienen *S. aureus*, que se ha multiplicado por encima de  $10^5$  UFC/g de alimento y producido enterotoxinas, este nivel indica las condiciones insalubres en las cuales el producto puede ser perjudicial para la salud<sup>14</sup>. Los alimentos con frecuencia implicados incluyen carne de mamíferos y aves, leche y productos lácteos, ensaladas, productos de panadería, como pasteles rellenos de crema y chocolate<sup>14</sup>.

Los síntomas se manifiestan en las 4 horas siguientes a la ingestión del alimento contaminado (rango de 1 a 6 horas): náuseas, vómitos, dolor abdominal (que suelen ser bastante intensos), diarrea, sudoración, dolor de cabeza, postración y a veces un descenso en la temperatura corporal, esta enfermedad es autolimitada, generalmente se resuelve a las 24 a 48 h y la tasa de mortalidad es muy baja o nula<sup>3</sup>. Puede ser lo suficientemente grave como para justificar la hospitalización, sobretodo en niños, personas de edad avanzada o pacientes debilitados<sup>15</sup>.

### **3.4. Uso de Antibióticos en Veterinaria**

Los antibióticos pueden ser utilizados en los animales para los siguientes fines:

- Terapéutica: Para tratar una enfermedad infecciosa.
- Profilaxis: En casos en que esté demostrado su importancia para prevenir una infección.
- Metafilaxia: Cuando se presenta casos compatibles con enfermedad infecciosa en el hato, en cuyo caso todo el lote de animales es tratado.
- Promotor de crecimiento: El cual es administrado en dosis subterapéutica, y actúa modificando la microbiota intestinal, provoca una disminución de microorganismos causantes de enfermedades subclínicas y reduce la microbiota que compite con el huésped por los nutrientes<sup>17, 18</sup>.

#### **3.4.1. Uso de Antibióticos en la Ganadería Lechera**

Los antibióticos son drogas que se usan para combatir infecciones tales como mastitis, neumonía o infecciones de las patas. Son administrados a los animales en diferentes formas, siendo las más comunes la intramamaria o la inyección intramuscular. La presencia de residuos de antibióticos en la leche es un problema que aqueja a toda la industria lechera, debido a que cantidades mínimas de antibióticos en la leche representan un problema de salud pública que no debe ser aceptado, además de ser ilegal. Se ha determinado que cantidades mínimas como 0.003 UI (unidades internacionales) de penicilina/mL en la leche, pueden afectar a una persona que sea alérgica a dicho antibiótico causando problemas como ardor en la piel, comezón, asma y shock anafiláctico. Además, existe el problema de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos que puede reducir o eliminar por completo su acción y uso en el tratamiento de enfermedades. Otro problema relacionado con los antibióticos es la clara interferencia en el procesado de queso, mantequilla y yogurt. Su presencia disminuye el ácido y afecta el sabor característico de la mantequilla. En el caso de los quesos, la presencia de antibióticos disminuye el cuajado de la leche y causa una mala maduración. Basados en estos problemas, los residuos de antibióticos en leche han atraído la atención a nivel mundial de los consumidores

y de los legisladores generando reglas estrictas que controlan el uso de antibióticos en los establos lecheros<sup>10</sup>.

### **3.4.2. Antibióticos de Uso Frecuente en el Ganado Bovino**

En la industria láctea, los antibióticos son principalmente usados con fines terapéuticos y profilácticos. Entre las infecciones más comunes que son tratadas se encuentran mastitis (más frecuente), seguida de diarrea, infecciones respiratorias (neumonía) e infecciones en período perinatal. Los antibióticos más comúnmente utilizados son: cloxacilina, penicilina, en caso de mastitis; trimetoprim-sulfametoxazol, en diarrea; oxitetraciclina en enfermedades respiratorias y perinatales<sup>19</sup>.

En el caso de las explotaciones lecheras en Lima, la mastitis es el principal problema sanitario asociado a las exigencias de la producción. Los agentes comúnmente presentes son *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma bovis* y *Escherichia coli*. Los productos más usados para el tratamiento incluyen penicilina sola o con estreptomicina y la enrofloxacin. Para otras enfermedades como diarrea y neumonía son usados trimetoprim, sulfadoxina, gentamicina para el primer caso y oxitetraciclina para el segundo<sup>17</sup>.

### **3.4.3. Mastitis en el Ganado Bovino**

Es la enfermedad más importante en la producción bovina, debido a la prevalencia y a las pérdidas económicas por disminución en la cantidad y calidad de la leche<sup>20</sup>. Se refiere a la inflamación de la glándula mamaria de la vaca. Se caracteriza por alteraciones físico químicas y casi siempre bacteriológica de la leche, teniendo alteraciones patológicas en la ubre que generalmente son de origen infeccioso<sup>10, 20</sup>.

De acuerdo a la intensidad de la infección puede ser:

- Mastitis subclínica, no se observan signos de la infección en la vaca, ni anormalidades en la leche, aunque esta última muestra cambios en su

composición (pH, número de células somáticas y concentración de iones). La infección no se detecta con facilidad y puede persistir por largos periodos, lo que a su vez constituye una fuente constante de microorganismos que finalmente infectan a otras vacas<sup>20, 21</sup>.

- Mastitis clínica se manifiesta con la presencia de coágulos en la leche, además de que la ubre está inflamada, caliente, enrojecida y dura. Al tratar de ordeñar a la vaca, muestra signos de dolor en la glándula infectada<sup>20, 21</sup>.

Los agentes infecciosos más importantes con predominio incluyen: *Streptococcus agalactiae*, *S. aureus*, *E. coli* (mastitis medioambiental), *Mycoplasma bovis*. Con menos frecuencia *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella sp*<sup>20</sup>.

#### **3.4.3.1. Mastitis estafilocócica**

Es la infección intramamaria producida por el *Staphylococcus aureus*, principal agente infeccioso por su prevalencia y patogenicidad, ocasionando más del 80% de las infecciones intramamarias<sup>22</sup>. En la vaca se encuentran en la superficie cutánea en particular sobre la piel de la ubre y los pezones, en estos puntos pueden incluso multiplicarse sin originar enfermedad. Los estafilococos pasan a la mama accidentalmente como consecuencia de aplicaciones descuidadas de antibióticos en las que se emplean instrumentales sucios. En los manipuladores (portadores), existe la posibilidad de que se produzca el paso a la leche en el acto del ordeño<sup>10</sup>.

#### **3.4.3.2. Antibióticos para el tratamiento de mastitis**

Los antibióticos recomendados son los siguientes: beta-lactámicos (penicilina, amoxicilina, ampicilinas, ceftiofur), aminoglicósidos (neomicina, gentamicina), macrólidos (estreptomicina, espiramicina, eritromicina, tilosina), lincosamidas (lincomicina), sulfonamidas con trimetoprim, quinolonas (enrofloxacin), tetraciclina<sup>10, 20, 22-24</sup>. Los tres primeros grupos son los más

comunes en otros países<sup>22</sup>. Se aconseja el tratamiento vía intramamaria, por ser la mejor vía de difusión en el tejido mamario<sup>20</sup>.

El uso indiscriminado de antibióticos en algunos países ha conllevado a un aumento en el porcentaje de especies bacterianas resistentes a diversos agentes antimicrobianos, las cuales han sido aisladas de leche procedente de glándulas mamarias con mastitis. Esta resistencia trae como consecuencia: una disminución en la respuesta al tratamiento en caso de mastitis clínica y la transmisión de bacterias resistentes a los consumidores a través de la cadena alimentaria, más aún cuando se consumen productos elaborados a partir de leche cruda<sup>23, 24</sup>.

### 3.5. Resistencia a Antibióticos

La resistencia a antibióticos es un grave problema de salud pública en diferentes partes del mundo, debido a que muchas enfermedades han dejado de responder a los antibióticos de uso común, tanto por su uso excesivo como por la falta de nuevos agentes en el mercado<sup>25</sup>. Es un fenómeno evolutivo natural, aunque su uso inapropiado en los seres humanos y los animales está acelerando el proceso<sup>26, 27</sup>. La aparición de resistencias de importancia clínica se ha desarrollado a los pocos años de su descubrimiento lo que conlleva a limitadas alternativas en los tratamientos<sup>2</sup> (ver Tabla 1). Además este problema hace que se prolonguen las estancias hospitalarias, se incrementen los costos médicos y aumente la mortalidad<sup>26</sup>.

**Tabla 1.** Antibióticos más importantes y resistencia clínica<sup>2</sup>

<b>Droga</b>	<b>Descubrimiento</b>	<b>Uso clínico</b>	<b>Resistencia clínica</b>
Penicilina	1928	1943	1954
Estreptomicina	1944	1947	1956
Tetraciclina	1946	1942	1956
Eritromicina	1952	1955	1956
Vancomicina	1956	1972	1994
Gentamicina	1963	1967	1968
Fluoroquinolonas	1978	1982	1985

El desarrollo de la resistencia bacteriana a los antibióticos está basado, principalmente, en dos factores: la presión selectiva por el empleo de estos

productos y la presencia de genes de resistencia<sup>25</sup>. Esto se debe a que las bacterias, por motivos de selección natural y adaptación genética, tienden a volverse más resistentes a los antibióticos, desarrollando diferentes mecanismos para resistir la acción que los antibióticos ejercen sobre ellas<sup>2, 26,27</sup>.

### **3.5.1. Tipos de resistencia:**

#### **3.5.1.1. Natural o intrínseca**

Es una propiedad específica de las bacterias, donde todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico<sup>2, 28</sup>.

#### **3.5.1.2. Adquirida**

Se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases en un cromosoma) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. En el primer caso, la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no sólo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con éstos<sup>2, 28</sup>.

En la transferencia horizontal, las bacterias en proximidad estrecha entre sí pueden compartir información genética a través de mecanismos tales como conjugación, transducción o transformación<sup>30</sup>. Estos pueden ocurrir en la tierra, en agua, en el sistema digestivo de los seres humanos y animales, así como en los alimentos<sup>2, 29</sup>. Tales eventos pueden servirles para adquirir capacidades que les permitan resistir el efecto bactericida o bacteriostático que suelen tener los antibióticos de uso común para erradicarlos. Este tipo de transferencia es reconocido como un medio importante para el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos entre bacterias patógenas<sup>30</sup>. La transmisión de genes de resistencia puede ocurrir incluso entre bacterias no emparentadas, entre el

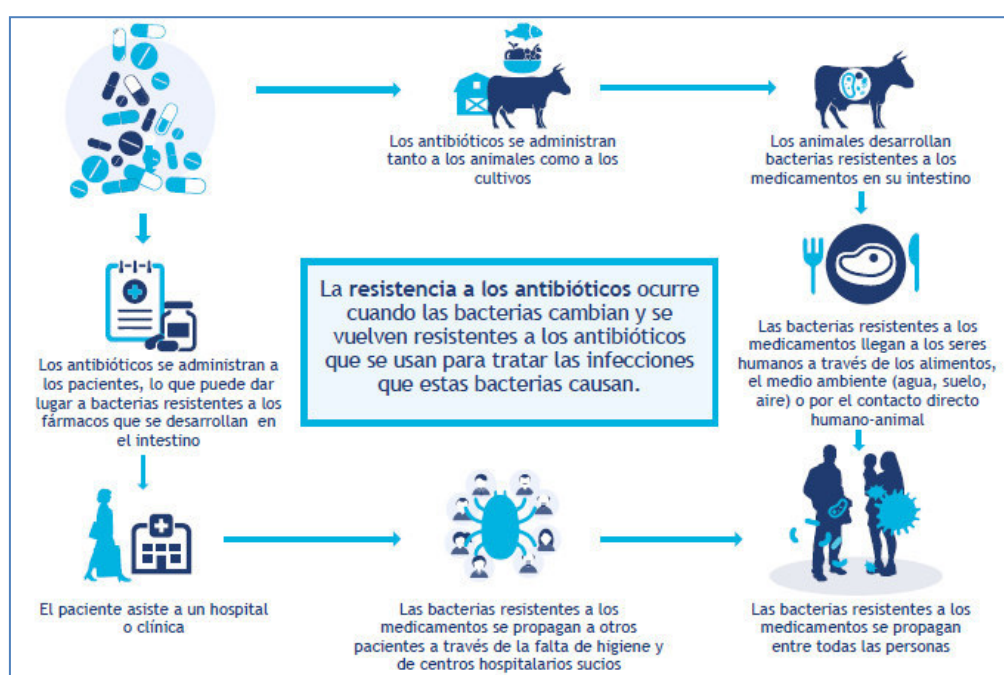


patógeno y bacterias con efectos benéficos para el hombre generalmente presentes en alimentos, esto hace que bacterias inocuas se conviertan en agentes reservorios de genes que puedan desencadenar la propagación desmedida de tales mecanismos de resistencia<sup>29, 30</sup>.

### 3.6. Resistencia a antibióticos transmitida por los alimentos

Los alimentos pueden actuar como vector para la transferencia de bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos a los seres humanos. Los alimentos pueden contaminarse con bacterias resistentes y/o genes de resistencia en varias formas, pues las bacterias resistentes a antibióticos se pueden encontrar en el suelo, agua, material fecal humano o animal o en el medio ambiente. Una primera forma es la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en los alimentos seleccionados por el uso de antibióticos durante la producción agropecuaria. Una segunda forma es la posible presencia de genes de resistencia en las bacterias que se añaden intencionadamente durante el procesamiento de alimentos (cultivos iniciadores, probióticos, otros)<sup>29</sup>. Una última forma es a través de la contaminación con bacterias resistentes a los antibióticos durante la elaboración de alimentos<sup>29, 31, 32</sup> (Ver Figura 1).

**Figura 1.** Ejemplo de cómo se propaga la resistencia a antibióticos (OMS)<sup>32</sup>.



### **3.7. Consecuencias de la resistencia a antibióticos transmitida por alimentos**

Las bacterias patógenas resistentes a antibióticos presentes en los alimentos constituyen un riesgo directo para la salud pública. Los genes de resistencia antibiótica en cepas comensales o patógenas constituyen un riesgo indirecto para la salud pública, ya que aumentan la reserva genética de la cual las bacterias patógenas pueden recoger rasgos de resistencia y posiblemente, transferirlos a otras bacterias<sup>29</sup>. Ello puede traer consigo un problema aún mayor: la multirresistencia. Los microorganismos no solamente son resistentes a una serie de drogas, sino que esa multirresistencia sigue siendo transferible, por lo que se transforman en reservorios de resistencia<sup>2, 29</sup>.

El efecto de los microorganismos patógenos resistentes a antibióticos puede dar lugar a fallos en los tratamientos médicos<sup>29</sup>. Un segundo efecto es que la elección de los antibióticos para el tratamiento es limitada, difícil y cara<sup>2, 26, 29, 33</sup>. Por último, la resistencia puede ir acompañada de un posible riesgo de aumento de la virulencia a través de la integración de la misma y plásmidos de resistencia<sup>29</sup>.

### **3.8. Mecanismo de Resistencia a Antibióticos**

Las bacterias pueden ser resistentes a los antibióticos mediante el uso de varios mecanismos: inactivación enzimática de los antibióticos, cambios en la permeabilidad de la membrana o pared celular bacteriana, expulsión por mecanismos activos del antibiótico, modificación de la diana del antibiótico<sup>29, 34</sup>.

#### **3.8.1. Mecanismo de Resistencia de *Staphylococcus aureus* a Antibióticos**

##### **3.8.1.1. Resistencia a los Betalactámicos:**

Se han caracterizado tres mecanismos de resistencia:

- a. Inactivación enzimática por betalactamasas (penicilinasas) que afecta a las penicilinas naturales y semisintéticas, pero no al resto de beta- lactámicos.
- b. Alteración de proteínas fijadoras de penicilina (PBPs), resistencia a la meticilina, que afecta a todos los betalactámicos. Esto se debe a la presencia del gen *mecA*, de localización cromosómica y de origen desconocido, el cual

codifica una proteína de unión alterada PBP2a o PBP2'. Las cepas con resistencia a la meticilina (SARM), que presentan el gen *mecA*, pueden tener resistencia múltiple a no betalactámicos, como los aminoglucósidos, macrólidos, fluoroquinolonas y tetraciclina, por tanto la observación de la multiresistencia debe hacer sospechar de la posibilidad de resistencia a meticilina.

- c. Tolerancia, que implica que un fármaco inhibe los estafilococos pero no los mata. Es decir para la lisis y muerte del microorganismo se requieren concentraciones de antibiótico mucho más elevadas que las necesarias para la inhibición de su crecimiento. Esto significa una disminución de la actividad autolítica por exceso de inhibidor de autolisinas (enzimas autolíticas responsables de la muerte bacteriana), lo que conlleva un efecto bactericida más lento<sup>34</sup>.

#### **3.8.1.2. Resistencia a Macrólidos, Lincosamidas y Streptograminas (MLS):**

Estos antibióticos actúan en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, impidiendo la traslocación de la cadena peptídica en la síntesis de proteínas. Estos mecanismos pueden ser de cuatro tipos:

- a. Modificación de la diana (ARNr 23S) por la acción de metilasas codificadas por los genes *erm(A)*, *erm(C)*, *erm(Y)*.
- b. Expulsión activa del antibiótico, codificado por los genes *mef(A)*, *mef(E)*, *mrs(A)*, *mrs(B)*, *erp(A)*, *vga(A)* y *vga(B)*.
- c. Inactivación del antibiótico por los genes *lnu(A)*, *vat(A)*, *vat(B)*, *vat(C)*, *vgb(A)* y *vgb(B)*.
- d. Modificación de la diana por mutación del ARNr 23S o de proteínas ribosómicas.

El mecanismo de resistencia más frecuente es el codificado por los genes *erm*. Los genes *erm(A)* están en SARM y su origen se halla en los transposones, mientras que los genes *erm(C)* son los responsables de la eritromicina en microorganismos sensibles a meticilina y son de origen plasmídico<sup>34</sup>.

#### 3.8.1.3. Resistencia a los Aminoglucósidos:

Se han caracterizado tres mecanismos:

- a. Mutaciones puntuales en la diana ribosómica.
- b. Entrada reducida por alteración de la permeabilidad.
- c. Modificación enzimática del antibiótico por acetilación, fosforilación o nucleotidilación de los grupos amino e hidroxilo.

El primer mecanismo afecta a la estreptomicina y se debe a la presencia de los genes cromosómicos *str(A)* y *str(B)*. La resistencia por alteraciones en la permeabilidad es infrecuente en *S. aureus* y se debe a una alteración en el transporte dependiente de energía. Finalmente la de mayor implicancia en clínica es la última, donde se han identificado ocho enzimas en *S. aureus*: cuatro nucleotidiltransferasas, tres fosfotransferasas y una acetiltransferasa. Los genes responsables de esta resistencia pueden encontrarse en plásmidos o en el cromosoma, siendo habitual también su presencia en los transposones. En esta se halla con frecuencia resistencia a la gentamicina, tobramicina, amikacina, kanamicina<sup>34</sup>.

#### 3.8.1.4. Resistencia a las Fluoroquinolonas:

Se han descrito varios mecanismos de resistencia:

- a. Mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB*, que codifican la producción de la ADN-girasa (topoisomerasa II)
- b. Mutaciones en los genes *parC* y *parE*, que codifican la producción de la topoisomerasa IV.
- c. Mutaciones en el gen *norA*, responsables de un mecanismo de expulsión activa.

Las mutaciones responsables de la resistencia se producen primero en los genes que codifican la topoisomerasa IV (diana primaria de *S. aureus*) y luego en la topoisomerasa II (diana secundaria). Las diferencias en la actividad de las fluoroquinolonas dependerán de la afinidad de ellas por las topoisomerasas y de la concentración que alcancen dentro de la célula. Las menos activas son el norfloxacin y el ciprofloxacino, seguido del ofloxacino, levofloxacino y esparfloxacino<sup>34</sup>.

#### **3.8.1.5. Resistencia a glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina):**

El mecanismo de resistencia consiste en alteración de la estructura del peptidoglicano que conduce a un engrosamiento de la pared y determina un secuestro del glucopéptido, impidiendo su unión a los residuos de D-alanina-D-alanina, que es su diana. También presentan un aumento de la expresión de algunas PBPs<sup>34</sup>. La resistencia a la vancomicina se debe a la adquisición del gen *van*. Este gen se transfiere a través de un plásmido. Finalmente, cambios en la biosíntesis del peptidoglicano guardan relación con esta resistencia<sup>34, 35</sup>.

#### **3.8.1.6. Resistencia a Oxazolidonas**

Principalmente para el Linezolid, la resistencia se debe a la mutación G2576U en el gen que codifica la subunidad 23S del ARNr. Recientemente se ha descrito otro mecanismo de resistencia plasmídica de alto nivel al linezolid, mediada por el gen *cfr*, que codifica una metil-transferasa que modifica la diana del 23S ARNr. Este gen está ligado al gen *ermB* y, conjuntamente, producen resistencia a todos los antibióticos que actúan en el ribosoma<sup>34</sup>.

#### **3.8.1.7. Resistencia al Cloranfenicol**

El cloranfenicol es un agente antimicrobiano bacteriostático. Actúa inhibiendo la transpeptidación en la síntesis proteica, al unirse a la subunidad 50s del ribosoma. La resistencia de *S.aureus* a éste antibiótico es debida a su modificación enzimática por una acetiltransferasa, mediada por plásmidos<sup>35</sup>.

#### **3.8.1.8. Resistencia a Tetraciclinas**

Las tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30S del ribosoma, tras atravesar la membrana bacteriana de forma activa.

La resistencia a las tetraciclinas es bastante frecuente por *S. aureus* y por SARM, depende de dos mecanismos:

- a. La disminución de penetración en la bacteria, mediada por plásmidos.
- b. El aumento del flujo de salida del fármaco, dependiente de un determinante cromosómico<sup>35</sup>.

### **3.8.1.9. Resistencia a Sulfamidas y Trimetoprim**

La resistencia de *S.aureus* a las sulfamidas es mucho más común que al trimetoprim. La asociación de ambos fármacos en forma trimetoprim-sulfametoxazol resulta sinérgica incluso cuando las cepas son resistentes a las sulfamidas. Finalmente, la resistencia se produce por aumento de la producción de ácido paraaminobenzoico, gracias a una mutación cromosómica<sup>35</sup>.

## **3.9. Factores que Favorecen la Aparición y Propagación de la Resistencia**

Son múltiples los factores que originan este problema. Sin embargo, el factor más importante es probablemente el uso excesivo e inapropiado de antibióticos<sup>2, 26</sup>.

Otro factor es el uso de agentes antimicrobianos en el ganado para promover el engorde y crecimiento, prevenir o tratar infecciones que ha contribuido al proceso de selección de bacterias resistentes, éstas a su vez pueden estar presentes en los animales productores de alimentos y luego causar enfermedad en humanos<sup>2, 31, 36</sup>. Se sostiene que la exposición prolongada a dosis bajas de antibióticos tiene más probabilidades de dar origen a la aparición de resistencias a éstos, que el tratamiento o la prevención de infecciones en animales productores de alimentos<sup>2, 33</sup>. Esto debido a la presencia de residuos de antibióticos en los productos de origen animal (leche o carne) destinados al consumo humano que permiten el desarrollo de la resistencia antibiótica en bacterias patógenas<sup>25</sup>.

También destacan las deficiencias en materia de prevención y control de infecciones, donde es necesario adoptar medidas en todos los niveles de la sociedad para reducir el impacto de este fenómeno y limitar su propagación, como por ejemplo, a través de la vacunación, el lavado de las manos, buenas prácticas en todas las etapas de la producción y el procesamiento de alimentos<sup>26</sup> y el uso apropiado de antibióticos bajo supervisión del médico o médico veterinario y farmacéutico<sup>25, 26</sup>.

### **3.10. Consideraciones para la selección de los discos de sensibilidad antibiótica**

El antibiograma se realizó de acuerdo a lo indicado en el manual del INS, donde la selección de los antibióticos se realiza teniendo en cuenta criterios establecidos: representatividad de una familia de antibióticos, estabilidad de la molécula en los discos para antibiograma, presencia en el mercado nacional, importancia para la vigilancia de la resistencia bacteriana. Además los antibióticos fueron distribuidos en dos grupos:

- a. Grupo 1: Cuya inclusión en el antibiograma y reporte de los mismos es de carácter Obligatorio: Oxacilina, Penicilina, Vancomicina, Gentamicina.
- b. Grupo 2: Este grupo reúne antibióticos complementarios cuya inclusión en el antibiograma y reporte es de carácter Opcional: Norfloxacino<sup>37</sup>.

## **IV. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1. Diseño**

Descriptivo, transversal, prospectivo.

### **4.2. Materiales**

Queso frescos.

### **4.3. Tamaño de la muestra y plan de muestreo**

Se recolectaron 40 muestras, las cuales corresponden a 10 muestras de queso fresco por cada mercado de Lima Metropolitana: La Parada, Valle Sagrado Huáscar, Mercado Central y Caquetá. La unidad de muestra representativa fue de 100 g de queso, tomándose 2 muestras de cinco puestos o puntos de venta por mercado. La recolección se llevó a cabo en las mismas condiciones en que es distribuido en el punto de venta y recogiendo cortes de la parte superior, central e inferior del molde del alimento<sup>38</sup>.

Cada muestreo se realizó utilizando un muestreo aleatorio ( tipo de muestreo probabilístico)<sup>38, 39</sup>. Este se llevó a cabo en los meses de noviembre a diciembre del 2013.

### **4.4. Transporte de muestras**

Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno de primer uso y transportadas en una caja de poliestireno expandido con hielo hacia el laboratorio para mantener la refrigeración de las mismas (0 - 4°C) <sup>38, 39</sup> y luego fueron procesadas inmediatamente dentro de las 2 horas posteriores al muestreo.

### **4.5. Lugar de ejecución:**

En el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.



## 4.6. Metodología de Trabajo

### 4.6.1. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* (ICMSF<sup>40</sup>)

- **Preparación y dilución de los homogenizados de muestras**

- Se desinfectó la superficie externa del envoltorio externo con alcohol de 70°.
- Se pesó 10 g representativos de la muestra a analizar.
- En condiciones de asepsia se añadió la muestra a una licuadora conteniendo 90 mL de agua peptonada al 0,1% y se homogenizó (dilución  $10^{-1}$ ).
- Seguidamente se realizó la dilución  $10^{-2}$  para lo cual se midió 1 mL de la dilución  $10^{-1}$  y se agregó en 9 mL de agua peptonada al 0,1%; a partir de esta dilución se prepararon las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ .

- **Recuento de *Staphylococcus aureus*: Método de siembra directa en placas de agar Baird Parker<sup>40</sup>.**

- Se prepararon diluciones de la muestra del alimento.
- Se preparó el agar Baird Parker en placas petri a razón de 15 mL a cada una y se dejó solidificar y secar.
- Se sembraron 0,1 mL de homogenizado y de sus diluciones en la superficie del medio contenido en placas independientes y se extendió el inóculo con ayuda de una espátula de vidrio.
- Se incubaron las placas a 37°C durante 30 a 48 hrs.
- Pasado el tiempo de incubación, se eligieron placas que contenían entre 20 y 200 colonias aisladas y se contaron todas las colonias negras y brillantes de margen estrecho y blanco rodeadas de zonas claras que se extienden en el medio opaco.
- Se seleccionaron las colonias sospechosas de *S. aureus* para realizar las pruebas de identificación.

- **Conservación de los aislados obtenidos**

Las colonias aisladas de *S. aureus* se conservaron en tubos con caldo TSB y glicerol 10% v/v, y congelados a -20°C, para someterlas posteriormente a pruebas de identificación<sup>37</sup>.

#### 4.6.2. Pruebas de Identificación de *Staphylococcus aureus*

- **Prueba de Coagulasa<sup>40</sup>**

- Las colonias sospechosas de ser estafilococos coagulasa positivo se sembraron en caldo BHI (Brain Heart infusión) y se incubaron durante 18 a 24 horas a 35-37°C.
- Pasado el tiempo de incubación, es transferido 0, 1 mL de cultivo a tubos de 10x 75mm conteniendo 0,3 mL de plasma de conejo y se incubaron en Baño Maria 35- 37° C.
- Se observaron la formación de coágulos en el intervalo de 4 horas.
- La formación de coágulos fueron observadas a diferentes intensidades (1+, 2+, 3+, 4+).
- La formación de coágulo a partir de 3+ de intensidad indicó un resultado positivo.

- **Prueba de DNasa<sup>41</sup>**

- Se prepararon placas con Agar DNA.
- Se inoculó un asa llena de crecimiento formando una banda de 2 cm de longitud del organismo en la superficie de la placa.
- Se incubaron las placas durante 18-24 horas a 35-37°C.
- Se agregó HCl 1N como indicador, que causa la precipitación del ADN polimerizado y hace al medio opaco, observándose un halo transparente alrededor de la colonia, esto corresponde a zonas de hidrólisis del ADN, de esta manera fue considerada la reacción positiva.

- **Prueba de Manitol<sup>41</sup>:**

- Se prepararon las placas con Agar Manitol Salado.
- Se sembró en superficie un inóculo denso de la muestra por estría.
- Se incubaron las placas a 35-37°C, durante 18-24 h. A las 24 horas se visualizó colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color.

#### 4.6.3. Prueba de Sensibilidad por el Método de Difusión en Disco Kirby Bauer<sup>37</sup>

- **Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland).**

Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó como estándar o patrón de comparación una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mc. Farland), preparada de la siguiente manera: Se agregó 0,5 mL de una solución de BaCl<sub>2</sub> 1% p/v a 99,5 mL de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% v/v en constante movimiento para mantener la suspensión.

- **Preparación del inóculo**

- a. De una placa de cultivo con el microorganismo aislado de las muestras incubadas por 18-24 h, se seleccionaron colonias aisladas y se preparó una suspensión directa en solución salina al 0,9 %.
- b. La suspensión se ajustó inmediatamente a la escala 0,5 de Mc. Farland. Se realizó a la vez, una suspensión con la bacteria de referencia (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923).

- **Inoculación de las Placas**

- a. Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.
- b. Se inoculó la superficie seca de la placa de MH, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Antes de haber colocado los discos se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial se absorbiera.

- **Aplicación de los discos**

Los discos de sensibilidad utilizados fueron: gentamicina, penicilina, vancomicina, norfloxacino y oxacilina.

- a. Se colocaron los discos individuales sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco asegurándose un contacto completo con la superficie del agar.

- b. Los discos no se removieron una vez que tomaron contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

- **Incubación**

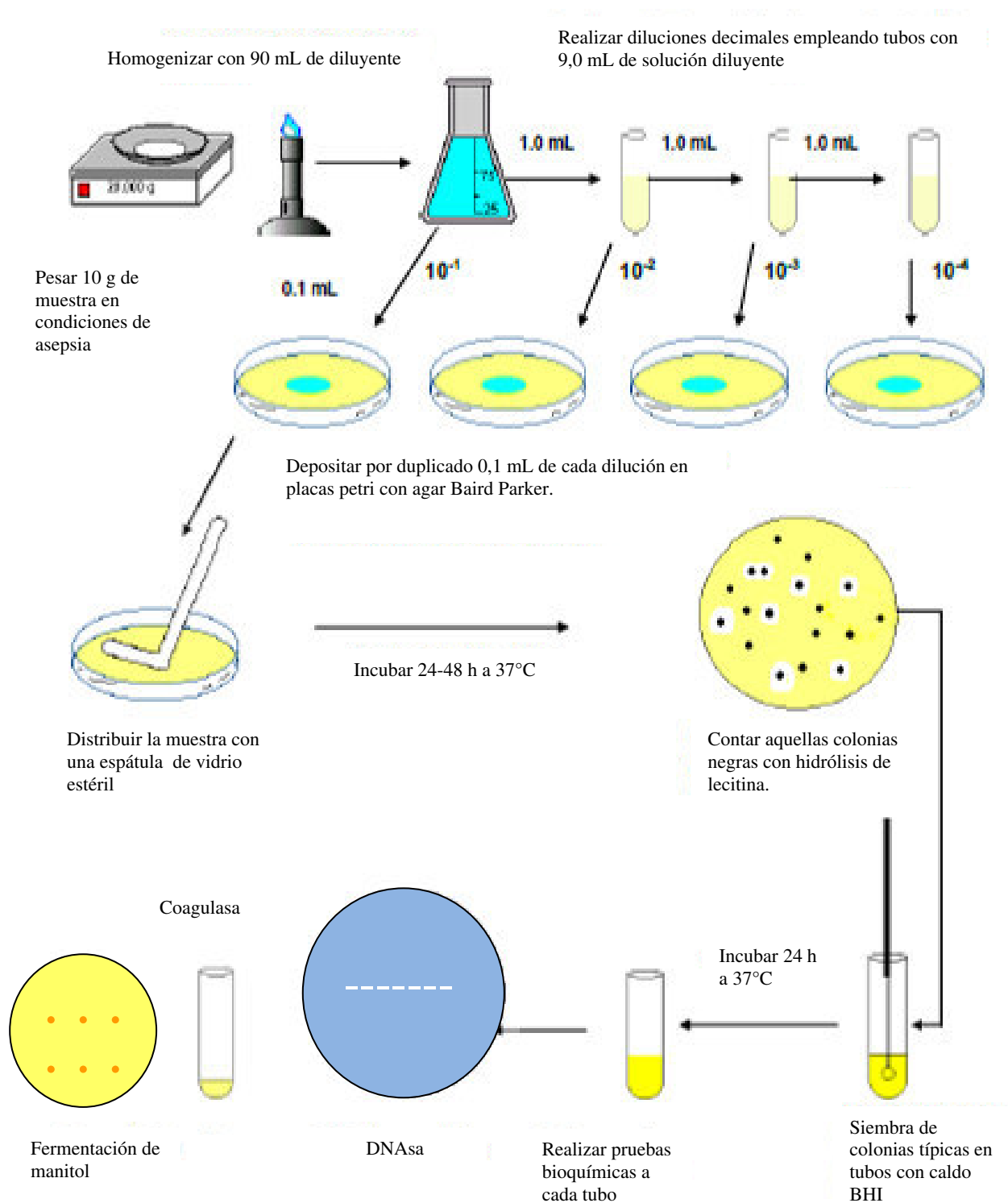
Se incubaron las placas a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, por un periodo de 24 horas. Después del tiempo de incubación se examinó cada placa y se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

- **Lectura de las placas e interpretación de los resultados.**

- a. Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando un vernier. Se mantuvo iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.
- b. El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

Los diámetros de inhibición fueron interpretados basándose en tabla N°7 en anexo N° 3. La sensibilidad de la cepa bacteriana fue reportada como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) <sup>37</sup>.

**Figura 2. Esquema para la determinación de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos**



(Esquema modificado, tomado de Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos según Norma Oficial Mexicana<sup>42</sup>)

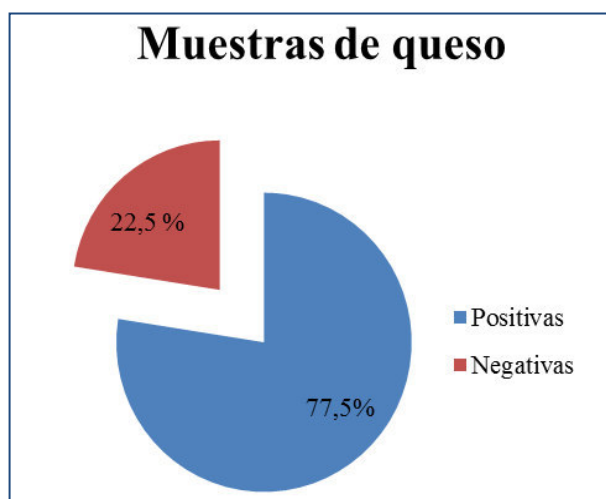
## V. RESULTADOS

De las 40 muestras de quesos frescos, procedentes de 4 mercados de Lima Metropolitana, 31 muestras de queso (77,5%) resultaron contaminadas con *S. aureus* (ver Figura 3, 4), asimismo todas éstas presentaron recuentos del microorganismo mayores a  $10^5$  UFC/g (ver Tabla 2).

De las muestras positivas, se logró aislar 33 cepas sospechosas, confirmándose 31 cepas de *S. aureus* coagulasa positivas mediante las pruebas de coagulasa, manitol salado, DNAsa (ver Tabla 3).

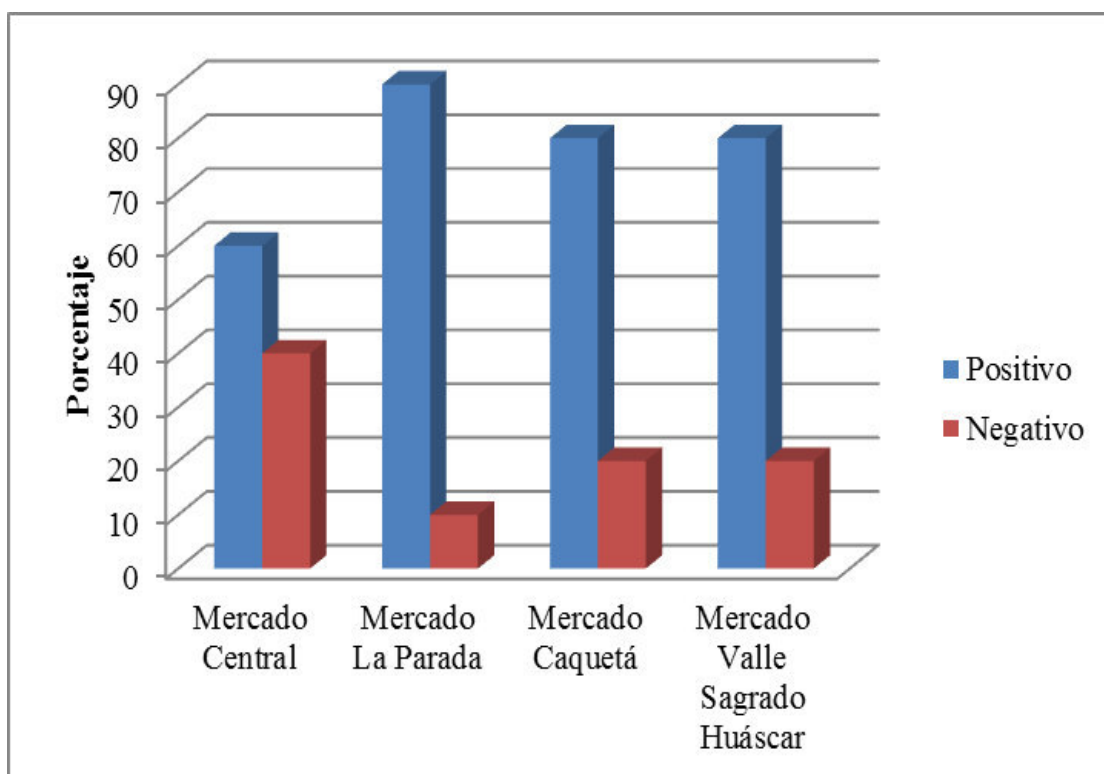
Las 31 cepas aisladas e identificadas resultaron resistentes a penicilina (n=30, 96,77%), oxacilina (n=24, 77,42%), gentamicina (n=1, 3,23%), norfloxacino (n=1, 3,23%). También presentaron sensibilidad a vancomicina (n=31, 100%), gentamicina (n=30, 96,77%) y norfloxacino (n=30, 96,77%) (Ver Tablas 4 y 5, Figura 5). Asimismo 5, 24 y 1 cepas fueron resistentes a uno, dos y tres antibióticos, respectivamente (ver Tabla 6). La resistencia de cepas de *S. aureus* a dos o más antibióticos representó el 80,64% (25/31).

**Figura 3.** Porcentaje de muestras de queso fresco positivas al aislamiento de *S. aureus*



De las 40 muestras de quesos frescos analizadas, 31 de ellas (77,5%) presentaron contaminación con *S. aureus*

**Figura 4.** Porcentaje de resultados positivos y negativos al aislamiento de *S. aureus* en quesos frescos según mercado de procedencia



Las muestras contaminadas con *S. aureus* presentaron mayor porcentaje las provenientes del mercado La Parada (90%), seguido de los mercados Caquetá (80%), Valle Sagrado Huáscar (80%) y Mercado Central (60%)

**Tabla 2.** Recuento de *S. aureus* en UFC/g de queso fresco

MERCADOS	PUNTOS DE VENTA	Nº	MUESTRA QUESO	UFC/g
<b>MERCADO CENTRAL</b> (Cercado de Lima) 10 muestras	A	1	Q1	3,1 x 10 <sup>5</sup>
		2	Q2	2,2 x 10 <sup>5</sup>
	B	3	Q3	1,4 x 10 <sup>5</sup>
		4	Q4	2,7 x 10 <sup>5</sup>
	C	5	Q5	< 10
		6	Q6	< 10
	D	7	Q7	< 10
		8	Q8	2,2 x 10 <sup>5</sup>
	E	9	Q9	< 10
		10	Q10	2,6 x 10 <sup>5</sup>
<b>MERCADO LA PARADA</b> (La Victoria) 10 muestras	A	1	Q11	< 10
		2	Q12	3,2 x 10 <sup>5</sup>
	B	3	Q13	2,6 x 10 <sup>5</sup>
		4	Q14	1,2 x 10 <sup>5</sup>
	C	5	Q15	2,5 x 10 <sup>5</sup>
		6	Q16	2,3 x 10 <sup>5</sup>
	D	7	Q17	3,8 x 10 <sup>5</sup>
		8	Q18	3,4 x 10 <sup>5</sup>
	E	9	Q19	1,3 x 10 <sup>5</sup>
		10	Q20	2,2 x 10 <sup>5</sup>
<b>CAQUETÁ</b> (San Martín de Porres) 10 muestras	A	1	Q21	3,6 x 10 <sup>5</sup>
		2	Q22	< 10
	B	3	Q23	2,8 x 10 <sup>5</sup>
		4	Q24	2,5 x 10 <sup>5</sup>
	C	5	Q25	3,4 x 10 <sup>5</sup>
		6	Q26	< 10
	D	7	Q27	2,7 x 10 <sup>5</sup>
		8	Q28	2,8 x 10 <sup>5</sup>
	E	9	Q29	1,6 x 10 <sup>5</sup>
		10	Q30	2,7 x 10 <sup>5</sup>
<b>VALLE SAGRADO HUÁSCAR</b> (San Juan de Lurigancho) 10 muestras	A	1	Q31	2,2 x 10 <sup>5</sup>
		2	Q32	3,5 x 10 <sup>5</sup>
	B	3	Q33	2,9 x 10 <sup>5</sup>
		4	Q34	2,1 x 10 <sup>5</sup>
	C	5	Q35	1,8 x 10 <sup>5</sup>
		6	Q36	2,3 x 10 <sup>5</sup>
	D	7	Q37	1,2 x 10 <sup>5</sup>
		8	Q38	2,4 x 10 <sup>5</sup>
	E	9	Q39	< 10
		10	Q40	< 10

En el recuento en placa resultaron muestras con crecimiento por encima de 10<sup>5</sup>UFC de *S. aureus* por gramo de queso fresco.



**Tabla 3.** Pruebas de Identificación de cepas de *S. aureus*

CEPA (obtenida por muestra)	Lecitinasa	Coagulasa	DNasa	Manitol Salado	Presencia de <i>S. aureus</i>
C1	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C2	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C3	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C4	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C8	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C10	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C12	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C13	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C14	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C15	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C16	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C17	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C17-1	+	-	-	-	<i>Staphylococcus spp.</i>
C18	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C19	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C20	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C21	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C23	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C24	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C25	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C27	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C28	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C29	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C30	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C31	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C32	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C33	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C34	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C35	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C36	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C37	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>
C37-1	+	-	-	-	<i>Staphylococcus spp.</i>
C38	+	+	+	+	<i>S.aureus</i>

**Leyenda:**

(+) = Resultado positivo.

(-) = Resultado negativo.

Las 33 cepas sospechosas fueron sometidas a pruebas de identificación bioquímica, siendo dos de las cepas sospechosas (C17-1 y C37-1) negativas a las pruebas de coagulasa, DNasa y manitol salado, por lo que se confirmaron sólo 31 cepas *S. aureus* coagulasa positivas.

**Tabla 4.** Perfil de Sensibilidad Antimicrobiana de cepas de *S. aureus* coagulasa positivas

<b>CEPA</b> <i>(obtenida por muestra)</i>	<b>Prueba de Sensibilidad</b>				
	<b>GE</b>	<b>P10</b>	<b>VA30</b>	<b>NOR10</b>	<b>OX1</b>
C1	S	R	S	S	R
C2	S	R	S	S	R
C3	S	R	S	S	R
C4	S	R	S	S	S
C8	S	R	S	S	R
C10	S	R	S	S	R
C12	S	R	S	S	R
C13	S	R	S	S	R
C14	S	R	S	S	S
C15	R	R	S	S	R
C16	S	R	S	R	I
C17	S	R	S	S	R
C18	S	R	S	S	R
C19	S	S	S	S	S
C20	S	R	S	S	R
C21	S	R	S	S	S
C23	S	R	S	S	R
C24	S	R	S	S	R
C25	S	R	S	S	S
C27	S	R	S	S	R
C28	S	R	S	S	S
C29	S	R	S	S	R
C30	S	R	S	S	R
C31	S	R	S	S	R
C32	S	R	S	S	R
C33	S	R	S	S	R
C34	S	R	S	S	R
C35	S	R	S	S	R
C36	S	R	S	S	R
C37	S	R	S	S	R
C38	S	R	S	S	R

**Leyenda:**

- **R = Resistente, S = Sensible, I = Intermedio**
- **Antibióticos: GE= Gentamicina, P10= Penicilina, VA30=Vancomicina, NOR10= Norfloxacino, OX1= Oxacilina**

Se muestra la susceptibilidad de cepas de *S. aureus* coagulasa positivas a los antibióticos seleccionados y disponibles para el estudio, mediante la medición del diámetro del halo de inhibición, clasificándolas como resistente, sensible e intermedio de acuerdo al manual del INS.

**Tabla 5.** Porcentaje de la susceptibilidad antibiótica de cepas de *S. aureus* coagulasa positivas

<i>Antibióticos</i>	<i>N° cepas</i>	<i>Sensible</i>		<i>Resistente</i>		<i>Intermedio</i>	
		<i>N°</i>	<i>%</i>	<i>N°</i>	<i>%</i>	<i>N°</i>	<i>%</i>
<b>Gentamicina</b>	31	30	96,77	1	3,23	0	0
<b>Penicilina</b>	31	1	3,23	30	96,77	0	0
<b>Vancomicina</b>	31	31	100	0	0	0	0
<b>Norfloxacino</b>	31	30	96,77	1	3,23	0	0
<b>Oxacilina</b>	31	6	19,35	24	77,42	1	3,23

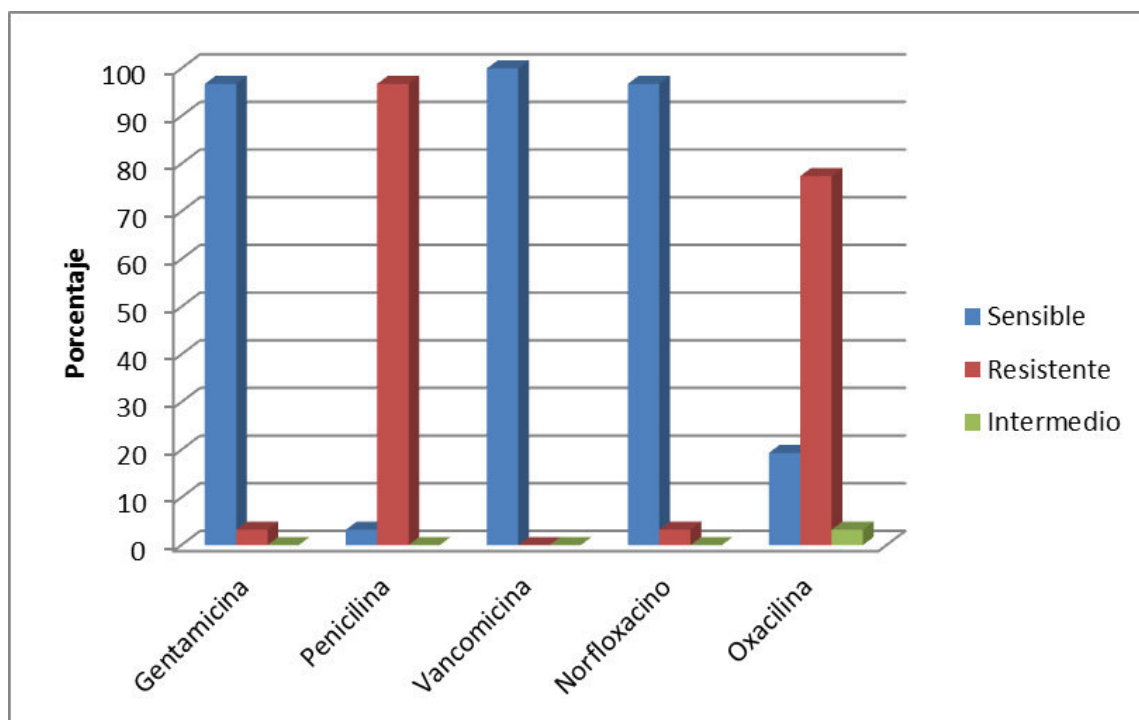
Se muestra la susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* coagulasa positivas por cada antibiótico evaluado en el estudio.

**Tabla 6.** Porcentaje de cepas de *S. aureus* coagulasa positivas que presentan resistencia a antibióticos

<i>Antibióticos</i>	<i>N° cepas</i>	<i>Cepas con resistencia</i>	
		<i>N°</i>	<i>%</i>
<b>Penicilina</b>	31	5	16,12
<b>Penicilina, Oxacilina</b>	31	24	77,42
<b>Gentamicina, Penicilina, Oxacilina</b>	31	1	3,23

Se muestra la resistencia de las cepas de *S. aureus* coagulasa positivas a uno, dos y tres antibióticos.

**Figura 5.** Porcentajes de resistencia, sensibilidad y sensibilidad intermedia de cepas de *S. aureus* coagulasa positivas



Se muestra los porcentajes de resistencia de cepas de *S. aureus* coagulasa positivas, mayor para penicilina (96,77%), oxacilina (77,42%), menor para gentamicina (3,23%) y norfloxacin (3,23%). También los porcentajes de sensibilidad a vancomicina (100%), gentamicina (96,77%) y norfloxacin (96,77%) además la sensibilidad intermedia a oxacilina (3,23%).

## VI. DISCUSIÓN:

El queso es una de las principales fuentes proteicas de mayor consumo de las cuales se aíslan con mayor frecuencia estafilococos coagulasa positivos; la humedad y nutrientes brindan un sustrato ideal para el crecimiento y desarrollo de *S. aureus*<sup>4,6</sup>. Este es un microorganismo muy versátil, capaz de adaptarse a la presión selectiva de los antibióticos y generar resistencia que fácilmente se puede propagar en la comunidad a través del consumo de los alimentos<sup>1, 5, 6, 24, 34</sup>, a su vez se relaciona con ETA como la intoxicación alimentaria, por su habilidad de producir enterotoxinas termoestables<sup>1,3,13,40</sup>.

La contaminación del queso con *S. aureus*, puede ocurrir directamente desde los animales de consumo, los cuales pueden estar infectados y por ende también sus productos alimentarios<sup>1-3, 31</sup>, como quesos frescos por la utilización de leche cruda y sin pasteurizar<sup>6, 24, 30</sup>. Por otro lado, no se siguen las normas de higiene adecuadas, lo que trae como consecuencia que el producto obtenido resulte contaminado o que esta contaminación se genere después de elaborado, como consecuencia de un inadecuado almacenamiento (sin refrigeración) o a la exposición ambiental (equipo y superficies) en los lugares donde se comercializa y/o por parte de los manipuladores de alimentos (portadores) según Puig *et al*<sup>6</sup>, FDA<sup>15</sup>. Además existe un alto riesgo de aumento de la población microbiana durante su comercialización<sup>1, 12, 43, 44</sup>.

En el presente estudio, los mercados que presentaron mayor prevalencia de muestras contaminadas fueron el mercado La Parada (90%) seguido de Caquetá (80%), Valle Sagrado Huáscar (80%) y Mercado Central (60%). De estos mercados se ha provisto de alimentos contaminados con microorganismos patógenos siendo materia de investigación por otros autores<sup>4, 45-47</sup>, debido a la infraestructura de las instalaciones y las deficientes condiciones higiénicas y saneamiento en el proceso de elaboración o almacenamiento representan un riesgo para el consumidor; posiblemente estas características de los espacios de venta sean factores de contaminación de las muestras de queso recolectadas en el presente estudio. Ante lo señalado es crucial lograr condiciones adecuadas de almacenamiento, transporte y manipulación del producto final en los mercados donde se comercializa así como lo señala Cristobal y Murtua<sup>12</sup>

Los resultados del análisis de 40 muestras de queso, 31 de ellas (77,5%) presentaron contaminación con *Staphylococcus aureus*, porcentaje similar a lo reportado por Zuta<sup>4</sup>, (75%) y Alvarado *et al*<sup>1</sup> (83%).

Todas las 31 muestras contaminadas presentaron recuentos de *S. aureus* por encima de  $10^5$  UFC/g, valores superiores a lo establecido por la NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01<sup>48</sup>, que indica un rango de  $10-10^2$  UFC/g de queso para ser considerado apto para consumo humano. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Zuta<sup>4</sup>, donde obtuvo 28 de 60 de muestras analizadas (46,7%) del mercado de Caquetá, y similares a lo obtenido por Cristobal y Mautua<sup>12</sup>, que evaluaron 34 de 39 muestras (87,2%) de quesos frescos artesanales de mercados municipales de Pueblo Libre.

Estudios previos señalan que niveles de contaminación de *S. aureus* superiores a  $10^6$  UFC/g pueden favorecer la producción de enterotoxinas estafilocócica en condiciones ambientales adecuadas tal como lo reporta Bécquer<sup>49</sup>. La FDA<sup>15</sup> menciona que niveles superiores a  $10^5$  UFC/g, son un indicador de condiciones no sanitarias en que el alimento puede estar envuelto y ser dañinos para la salud. Según la DIGESA, Perú<sup>38</sup>, cantidades mayores a  $10^4$  UFC/g de alimento pueden producir enterotoxinas que desencadenan intoxicación alimentaria por estafilococos en los consumidores. En el presente trabajo la presencia de un número elevado del microorganismo en el alimento indica una deficiente manipulación y saneamiento, por lo que solo se puede considerar al queso como un riesgo potencial al consumidor por el peligro latente de ETA. Por otro lado no es suficiente vincularlo con riesgo de intoxicación alimentaria, por lo que debe demostrarse su capacidad para producir enterotoxinas por métodos ya establecidos como lo desarrollado por otros autores<sup>4</sup>.

En el caso del antibiograma realizado, la resistencia a penicilina se reporta ampliamente en el estudio (96,77%). La penicilina ha sido el tratamiento de elección para la mastitis bovina desde 1940, y a nivel mundial se reporta este fenotipo de resistencia como el más comúnmente observado, según Valero *et al*<sup>24</sup>. Estudios similares obtuvieron porcentajes menores como el de Puig *et al*<sup>6</sup> (2015), 52,9%, Alvarado *et al*<sup>1</sup> (2011), 52,5%, y Rivera *et al*<sup>30</sup> (2011) un 44% en cepas de *S. aureus*

aisladas de queso. Para Cedillos y Guerra<sup>10</sup> (2012), el 100% presentaron resistencia a la penicilina, siendo similares a los obtenidos en el presente estudio.

El CLSI<sup>50</sup> establece que *S. aureus* resistente a meticilina/oxacilina (SARM), es aquella cepa de *S. aureus* que expresa el gen *mecA* u otro mecanismo de resistencia a meticilina, como cambios en la afinidad de proteínas de unión a la penicilina por oxacilina. Además es considerado resistente a agentes  $\beta$ -lactámicos, es decir penicilina, y combinaciones de inhibidores de  $\beta$ -lactámico/  $\beta$ -lactamasa<sup>50</sup>. En el presente estudio el uso de discos de oxacilina pudo indicar una posible detección de cepas de SARM, aunque para asegurar esto se debe confirmar la presencia del gen específico mediante pruebas, como Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los resultados del estudio presentaron resistencia (77,42%) superiores a lo obtenido por Puig *et al*<sup>6</sup> (24,1%), Rivera *et al*<sup>30</sup> (20%), Alvarado *et al*<sup>1</sup> (15%). Estas cepas resistentes a oxacilina también presentaron resistencia a penicilina, lo que afirmaría lo señalado por el CLSI<sup>50</sup>.

La presencia de SARM en alimentos ya no es desconocida y es considerada un riesgo potencial para la salud del consumidor, según Herrera y Santos<sup>51</sup> (Colombia, 2015), y Fonseca *et al*<sup>52</sup> (Brasil, 2011) quienes detectaron SARM en 9 y 1 muestras de queso, respectivamente. Esto resulta de gran importancia por ser el SARM un patógeno capaz de ocasionar una gran variedad de manifestaciones clínicas en el hombre, desde infecciones leves en la piel, bacteriemia, neumonía, endocarditis, síndrome del shock tóxico e, incluso, la muerte<sup>51</sup>.

Se presenta una alta sensibilidad a la gentamicina (96,77%) en el presente trabajo que es comúnmente obtenida por Alvarado *et al*<sup>1</sup> y Rivera *et al*<sup>30</sup> (100%). Sin embargo la obtención de una cepa resistente (3,23%) a este antibiótico, similar a lo obtenido por Puig *et al*<sup>6</sup> (0,7%), afirmaría lo señalado por Solimano<sup>17</sup> que la gentamicina usada con frecuencia en el ganado bovino para contrarrestar problemas respiratorios e infecciones gastrointestinales, puede generar resistencia de manera rápida.

En el caso del norfloxacin, se utilizó para evaluar la susceptibilidad a las quinolonas. Cabe mencionar que el enrofloxacin y ciprofloxacino son los

medicamentos más utilizados en veterinaria<sup>18, 53, 54</sup>. La alta sensibilidad al norfloxacino (96,77%) hace que el medicamento sea útil en el tratamiento, pero existe la posibilidad de mostrar resistencia como lo obtenido en el presente estudio (3,23%). En otros estudios se ha evaluado la susceptibilidad a otra quinolona del grupo del norfloxacino, como el ciprofloxacino encontrándose alta sensibilidad en los estudios de Benitez y Centi<sup>55</sup>, Cedillos y Guerra<sup>10</sup>, y baja resistencia como lo registrado por Rivera *et al*<sup>30</sup> (4%) y Puig *et al*<sup>6</sup> (4,4%).

Todas las cepas mostraron ser susceptibles a vancomicina (100%), similar a lo que obtuvo Alvarado *et al*<sup>1</sup>, Rivera *et al*<sup>30</sup>, Benitez y Centi<sup>55</sup>. La vancomicina que no es utilizada en medicina veterinaria, sin embargo es probada para monitorear el grado de susceptibilidad y resistencia, puesto que es un medicamento de primera elección frente a cepas de *S. aureus* meticilina resistentes en humanos<sup>26</sup>.

La alta resistencia múltiple (80,64%), es decir a dos o más antibióticos en los aislados de queso fresco es similar a la obtenida por Cedillos y Guerra<sup>10</sup> frente a tres antibióticos (80%), señalando que la causa puede ser un indicador del uso indiscriminado de antibióticos en los animales ya que estos se utilizan en el tratamiento y prevención de mastitis en vacas lecheras y en el tratamiento de diversas enfermedades.

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían significar el potencial riesgo que supone el consumo de este producto debido a la contaminación presente y la propagación de resistencia a antibióticos a la comunidad. El hallazgo de cepas de *S. aureus* con resistencia a más de un antibiótico, indica la necesidad de promover el uso racional de éstos en veterinaria y clínica, con el fin de evitar la aparición y propagación de cepas resistentes. Esto requerirá que se adopten medidas educativas y preventivas dirigidas a los manipuladores de alimentos en toda la cadena alimentaria.



## VII. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de *S. aureus* en quesos frescos representó 77,5%, donde el mayor porcentaje fueron las provenientes del mercado La Parada (90%), seguido de los mercados Caquetá (80%), Valle Sagrado Huáscar (80%) y Mercado Central (60%).
2. Las cepas de *S. aureus* coagulasa positivas aisladas, presentaron mayor resistencia a penicilina (96,77%), oxacilina (77,42%), y menor para gentamicina (3,23%) y norfloxacino (3,23%). Asimismo 5, 24 y 1 cepa fueron resistentes a uno, dos y tres antibióticos, respectivamente. La multirresistencia de cepas de *S. aureus* a dos o más antibióticos representó 80,64%.
3. Las cepas de *S. aureus* coagulasa positivas presentaron sensibilidad a vancomicina (100%), gentamicina (96,77%) y norfloxacino (96,77%).

## VIII. RECOMENDACIONES

Comprometer a la universidad en la colaboración con los municipios a fin de realizar campañas de capacitación en buenas prácticas (higiene y almacenamiento) y prevención a aquellas personas que expenden queso en los mercados para evitar la contaminación del mismo con *Staphylococcus aureus*. Realizar estudios con otros alimentos de amplio consumo donde se aíslen microorganismos patógenos resistentes a antibióticos, de tal manera que se genere una fuente de datos que aporten al control y vigilancia de este problema de Salud Pública con el fin de evitar aparición de resistencias y su propagación por los alimentos.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarado V, Mora M, Arias M, Rojas N, Chaves C. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus*, Costa Rica. Revista costarricense de Salud Pública. 2011; 20(2): 102-106. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-14292011000200006&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292011000200006&lng=en)
2. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública. Revista Producción y Sanidad Animal. 2004: 1-56. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y5468s.pdf>
3. Argudín M, Mendoza M, Rodicio M. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Toxins. 2010; 2(7):1751-73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22069659>.
4. Zuta N. Aplicación de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de enterotoxinas en *Staphylococcus aureus* aislados de alimentos en la ciudad de Lima. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú 2009.
5. Pahissa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1º Edición. Editorial ICG Marge, SL, Valencia 558, Barcelona, España, 2009, pp. 34-45. Disponible en: [v2rZbLAhWBmR4KHbWTA5IQ6wEIGzAA#v=onepage&q=Resistencia%20de%20Staphylococcus%20aureus&f=false](http://v2rZbLAhWBmR4KHbWTA5IQ6wEIGzAA#v=onepage&q=Resistencia%20de%20Staphylococcus%20aureus&f=false)
6. Puig Y, Espino M, Leyva V, Apórtela N, Pérez Y, Soto P. Resistencia a los antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas en alimentos y manipuladores. RCAN Revista. Cubana Alimentación y Nutrición. 2015; 25(2): 245-260. Disponible en: [www.revicubalimentanut.sld.cu/Vol\\_25\\_2/Articulo\\_25\\_2\\_245\\_260.pdf](http://www.revicubalimentanut.sld.cu/Vol_25_2/Articulo_25_2_245_260.pdf)
7. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. Producción y productos lácteos. Glosario. Disponible en:

<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/recursos-de-informacion/glosario/es/>

8. Norma Técnica Peruana 202.085:2015. Leche y Productos Lácteos. Definiciones y Clasificación, 4° Edición.
9. Ministerio de Salud de Perú, Dirección General de Salud Ambiental. NTS N°118-MINSA/DIGESA-V.01 “Norma Sanitaria que establece la Lista de Alimentos de Alto Riesgo (AAR)”. Perú. 2015.
10. Cedillos R, Guerra J. Determinación de la multirresistencia microbiana de *Staphylococcus aureus*, aislado a partir de diferentes fuentes que intervienen en la elaboración del queso fresco artesanal proveniente de dos queserías. [Trabajo de Graduación en Química y Farmacia]. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador, Centro América; 2012.
11. Codex Alimentarius. Leche y Productos Lácteos. 2° Edición. Roma, Italia, 2011, pp. 191-224. Disponible en <http://www.codexalimentarius.org>
12. Cristóbal R, Maurtua D. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus spp.* Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am J Public Health 2003; 14(3): 158 – 164.
13. Jay J, Loessner M, Golden D. Microbiología Moderna de los Alimentos. Cap. 23, Gastroenteritis Estafilocócica. 5° Edición, Ed. Acirbia S.A., Royo, 23-50006, Zaragoza, España, 2009, pp. 541-557.
14. Foodborne Disease Outbreak: Guidelines for Investigation and Control. World Health Organization 2008. Disponible en: <http://www.who.int/gfn/training/TClevel2/en/>
15. Food and Drug Administration. Bad Bug Book. Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2° Edición. 2012, pp. 87-91. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/causesofillnessbadbugbook/default.htm>

16. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenber P, Woods G. Koneman Diagnóstico Microbiológico. 6° Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 2008, pp. 595-606.
17. Solimano G, Fernández C, Romero R, Falcón N. Antibacterianos de empleo frecuente en ganado bovino destinado a la producción de leche y carne en Lima, Perú. Una Salud. Revista Sapuvet de Salud Pública, 2011; 2 (2): 81-94. Disponible en: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/us/article/viewFile/150/86>
18. Cancho B, García M, Simal J. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: Perspectiva actual. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 2000; 3(1): 39-47. España. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/11358120009487647>
19. Redding L, Cubas F, Sammel M, Smith G, Galligan D, Levy M, Hennessy S. The use of antibiotics on small dairy farms in rural Peru. Preventive Veterinary Medicine. 2014; 113(1): 88-95. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188819>
20. Morales H. Mastitis Bovina: Enfoque Biotecnológico. Edición 2011© ReCiTeIA, Cali, Colombia, 2011; 11(1b): 215-228. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=CEHjQKafbNIC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
21. Almeida D. Prevalencia de mastitis bovina mediante la prueba de California Mastitis Test e identificación del agente etiológico, en el centro de acopio de leche en la comunidad San Pablo Urco, Olmedo – Cayambe – Ecuador, 2014. [Tesis de Grado en Ingeniería Agropecuaria]. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, 2015
22. Pellegrino M, Bogni C, Odierno L, Frola I, Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. Argentina. 2011; 12(7): 121-14. Disponible en: <http://oai.redalyc.org/articulo.oa?id=63622567006>.
23. Andresen H. Mastitis: Prevención y Control. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2001; 12(2): 55-64. Disponible en: [www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf](http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v12n2/a10v12n2.pdf)

24. Valero K, Olivares Y, Perozo A, Valbuena E, Boscán L, Colina G. Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en leche de bovinos con mastitis subclínica y leche de tanque. Revista Científica, FCV-LUZ / 2010; 20 (4): 367-376. Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S079822592010000400006&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079822592010000400006&lng=es)
25. Falcón N, Ortega C, Gorniak S, Villamil L, Ríos C, Simón M. El problema de la resistencia a antibióticos en salud pública. Una Salud. Revista Sapuvet de Salud Pública. 2010; 1(1): 75-88. Disponible en: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/us/article/view/235>
26. Organización Mundial de la Salud, OMS. Resistencia a los antibióticos. Nota Descriptiva. 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>
27. Organización Mundial de la Salud, OMS. ¿Cómo detener la resistencia a los antibióticos? Siga las recomendaciones de la OMS. 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/stop-antibiotic-resistance/es/>
28. Fernández F, López J, Ponce L, Machado C. Resistencia Bacteriana. Revista Cubana Médica Militar. 2003; 32(1):44-48. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572003000100007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572003000100007)
29. Verraes C, Van S, Van E, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, de Schaetzen M, Van Huffel X, Imberechts H, Dierick K, Daube G, Saegerman C, De Block J, Dewulf J, Herman L. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. Int. J. Environ Res. Public Health. 2013; 10(7): 2643-69. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-4601/10/7/2643/htm>
30. Rivera J, Aranaga V, Zabala I, Atencio L, Navarro C, Mujica I. *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: Susceptibilidad a Antibióticos y su relación con plásmidos. Revista Científica FVC-LUZ. 2011; 21(3): 202-210. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95918239003>.

31. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponible en: [www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf](http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf)
32. Organización Mundial de la Salud, OMS. Resistencia a los antibióticos: infografías. 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/events/2015/world-antibiotic-awareness-week/infographics/es/>
33. Organización Mundial de la Salud, OMS. Resistencia a los antimicrobianos transferida por animales productores de alimentos. Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Nota informativa N° 2/2008 – Resistencia a los antimicrobianos. pp. 1-6. Disponible en: [www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_02\\_Antimicrobial\\_Mar08\\_ES.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_02_Antimicrobial_Mar08_ES.pdf)
34. Pahissa A. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. 1° Edición. Editorial ICG Marge, SL, Valencia 558, Barcelona, España, 2009, pp. 34-45. Disponible en: [v2rZbLAhWBmR4KHbWTA5IQ6wEIGzAA#v=onepage&q=Resistencia%20de%20Staphylococcus%20aureus&f=false](http://v2rZbLAhWBmR4KHbWTA5IQ6wEIGzAA#v=onepage&q=Resistencia%20de%20Staphylococcus%20aureus&f=false)
35. Changanqui C. Presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en granjas porcinas tecnificadas del departamento de Lima. [Tesis de grado en Medicina Veterinaria]. Lima, Perú. 2010.
36. Torres, C. y Zarazaga, M. Repercusiones en el Hombre del Consumo de Antibióticos por Animales. Revista Española de Quimioterapia. 1998; 11(1). Disponible en: [http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0198/rev1.html](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0198/rev1.html)
37. Ministerio de Salud de Perú, Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión, Serie de Normas Técnicas N° 30, Lima, Perú. 2002, pp.13-22.
38. Ministerio de Salud de Perú, Dirección General de Salud Ambiental. Manual de Análisis microbiológico de alimentos, Lima, Perú, 2001, pp. 12-27; 99-105.

39. Ministerio de Salud. DIGESA. Procedimiento para la Recepción de Muestras de Alimentos y Bebidas de Consumo Humano en el Laboratorio de Control Ambiental de la Dirección General de Salud Ambiental del Ministerio de Salud. Directiva Sanitaria N° 032 - MINSA/DIGESA - V.01. Perú 2011. pp. 10-27.
40. Moreno B, Díez V, García M, Menes I, Gutiérrez L, Francisco J. ICMSF. Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos. Microorganismos de los alimentos 1: Su significado y método de numeración. 2° Edición, Editorial Acribia S.A., Zaragoza. España. 1999.
41. Christian D. Merck Microbiology Manual. 12° Edition. 2012.
42. Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcusaureus\\_17365.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcusaureus_17365.pdf)
43. Luján D, Valentín M, Molina M. Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima-Perú. Revista de Salud Pública y Nutrición (RESPYN); 2006; 7(2): 1-5. Disponible en: [http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/articulos/quesos\\_frescos-1.htm](http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/articulos/quesos_frescos-1.htm).
44. Díaz C, González B. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. RESPYN, Revista de Salud Pública y Nutrición. 2001; 2(3):1-9 Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd42/queso.pdf>
45. Molleda M. Frecuencia de enterobacterias en queso fresco, carne molida y fresa en el mercado mayorista “La Parada”. [Tesis de Grado en Farmacia y Bioquímica]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 2016.
46. Azañero G, Chiroque M. Detección y cuantificación de residuos antimicrobianos en tejido muscular de pollo en cuatro mercados de Lima Cercado. [Tesis de Grado en Farmacia y Bioquímica]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 2010.
47. Barco C. Aplicación del sistema de análisis de riesgos y control de puntos críticos (HACCP) sobre la evaluación higiénico sanitaria de cuatro centros de



- abasto de Lima Metropolitana. [Tesis de Grado en Ciencias Biológicas]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. 2001.
- 48.** Ministerio de Salud de Perú, Dirección General de Salud Ambiental. NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01 Norma Sanitaria que Establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, Perú. 2008. pp. 1-23.
- 49.** Bécquer A, Mota L, Lara C. Importancia de la detección de enterotoxinas estafilocócicas. Rev. Cubana de Alimentación y Nutrición, 1996; 10(2). Disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10\\_2\\_96/ali12296.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_2_96/ali12296.htm)
- 50.** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S25. Pennsylvania, USA, 2015; 35(3):64-69.
- 51.** Herrera F, Santos J. Presencia de *Staphylococcus aureus* meticilina- resistentes en queso doble crema artesanal. Revista U.D.C.A. Actualidad y Divulgación Científica. 2015; 18(1):29-37. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012342262015000100005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012342262015000100005&lng=en).
- 52.** Fonseca C, Matté M, Dropa M, Mamizuka E, De Almeida L, Lincopan, N.; Matté G, Leal, P. Identification of *Staphylococcus aureus* carrying the mecA gene in ready-to-eat food products sold in Brazil. Foodborne Pathogens and Disease. 2011; 8(4): 561-563. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21453120>
- 53.** Organización Mundial de Sanidad Animal. OIE. Lista de Agentes Antimicrobianos importantes para la Medicina Veterinaria. 2015. pp. 1-9. Francia. Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/Sp\\_OIE\\_List\\_antimicrobials\\_Mayo2015.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Sp_OIE_List_antimicrobials_Mayo2015.pdf)
- 54.** Sumano H, Ocampo L. Quinolonas y Fluoroquinolonas. Farmacología veterinaria. 3° Edición. México. Editorial McGraw-Hill Interamericana, 2006, pp.305-328.

55. Benitez E, Centi K. Determinación de la resistencia del *Staphylococcus aureus* aislado de quesos no madurados comercializados en el mercado central de San Salvador, a los antibióticos de prueba seleccionados. Universidad de El Salvador. [Tesis de grado en Química y Farmacia]. San Salvador, El Salvador, 2012.
56. Ministerio de Salud de Perú, Dirección General de Salud Ambiental. NTS N°114-MINSA/DIGESA-V.01 “Norma Sanitaria para el almacenamiento de alimentos terminados destinados al consumo humano. Perú. 2015. pp. 1-15.
57. Asociación Nacional de Poliestireno Expandido. Disponible en: [www.eps@anape.es](mailto:www.eps@anape.es)

## **X. ANEXOS**

### **Anexo N°1**

#### **Materiales de Laboratorio**

##### **1. Medios de cultivo:**

- Agar Baird Parker - MERCK
- Agar DNAsa - MERCK
- Agar Manitol Salado - MERCK
- Agar Mueller Hinton - MERCK
- Agua Peptonada - MERCK
- Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) - MERCK
- Caldo Trypticase Soya - MERCK

##### **2. Discos de antibióticos:**

- Penicilina 10U (P10) - OXOID
- Oxacilina 1 µg (OX1) - OXOID
- Vancomicina 30 µg (VA30) - OXOID
- Gentamicina 10 µg (GE) - OXOID
- Norfloxacin 10 µg (NOR10) – OXOID

##### **3. Reactivos e insumos**

- Alcohol 70°C – Sigma Aldrich
- Plasma de conejo.
- Solución salina fisiológica NaCl 0,9%.
- BaCl<sub>2</sub> 1% - Sigma Aldrich.
- Glicerol 10% - Sigma Aldrich.
- HCl 0,1 N – Sigma Aldrich.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% - Sigma Aldrich.

##### **4. Otros materiales**

- Asa bacteriológica.
- Bolsas de polietileno de 60 x 30 cm
- Caja de poliestireno expandido (tecnopor).

- Espátula de vidrio (Drigalsky).
- Frascos de vidrio 100 – 500 mL (para preparación de medios).
- Guantes quirúrgicos de látex descartables
- Hisopos descartables
- Mascarilla quirúrgica descartable
- Perilla de goma.
- Pipetas de vidrio de 1- 10mL.
- Placas Petri de plástico 100 mm x 15 mm
- Plumón de tinta indeleble.
- Tubos de ensayo 13x100 (Pyrex)
- Tubos de ensayo 10x75 (Pyrex)
- Utensilios de acero inoxidable: cuchillos, cucharas, pinzas, espátula, tijeras.
- Vaso de licuadora.
- Vernier de acero (0-150mm)

## **5. Equipos:**

- Autoclave.
- Balanza eléctrica
- Base motor para licuadora
- Estufa para esterilizar material de vidrio.
- Incubadora a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$

## Anexo N°2

Tabla para la recolección, codificación y recuento de las muestras

MERCADOS	PUNTOS DE VENTA	N°	MUESTRA QUESO	UFC/g
MERCADO CENTRAL (Cercado de Lima)				
MERCADO LA PARADA (La Victoria)				
CAQUETÁ (San Martín de Porres)				
VALLE SAGRADO HUÁSCAR (San Juan de Lurigancho)				

## Anexo N° 3

**Tabla 7. Antibióticos y diámetros críticos para *Staphylococcus spp*<sup>37</sup>.**

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Penicilina	10 unidades	≤ 28	-	≥ 29
Oxacilina (S. aureus)	1 µg	≤ 10	11 – 12	≥13
(Estafilococos coagulasa negativos)	1 µg	≤ 17	-	≥ 18
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	-	-	≥ 15
Teicoplanina	30 µg	≤ 10	11 – 13	≥ 14
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15
FLUOROQUINOLONAS				
Norfloxacin	10 µg	≤ 12	13 – 16	≥ 17
Ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21
TETRACICLINAS				
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14 – 22	≥ 23
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	≤ 14	15 – 20	≥ 21
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18
Rifampicina	5 µg	≤ 16	15 – 19	≥ 20
Nitrofurantoína	300 µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Trimetoprim / Sulfametoxazol	1.25 / 23.75 µg	≤ 10	11 - 15	≥ 16

R = Resistente, I = Intermedio, S = Sensible

Cepa de Referencia para el Control de Calidad Interno *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

## Anexo N° 4

### Glosario:

**Alimento:** Toda sustancia elaborada o semielaborada o en bruto, que se destina al consumo humano, incluidas las bebidas, y cualesquiera otras sustancias que se utilicen en la fabricación, preparación o tratamiento de los alimentos<sup>9</sup>.

**Alimento perecible:** Son aquellos que para su conservación requieren ser almacenados en condiciones de refrigeración o fraccionamiento y destinado al consumo final<sup>56</sup>.

**Antibiograma:** Procedimiento de laboratorio que permite determinar la sensibilidad de un microorganismo ante diferentes antibióticos<sup>37</sup>.

**Antimicrobiano:** Un término general para las drogas, químicos u otras sustancias que matan o detienen el crecimiento de microorganismos. Entre los agentes antimicrobianos en uso hoy en día son los fármacos antibacterianos (que mata las bacterias), agentes antivirales (que matan a los virus), agentes antifúngicos (que matan hongos), y las drogas antiparasitarias (que matan parásitos)<sup>31</sup>.

**Antibiótico:** Sustancia química capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que es producida por un ser vivo o fabricada por síntesis<sup>31</sup>.

**Cadena alimentaria:** Fases que abarcan los alimentos desde la producción primaria hasta el consumo final<sup>9</sup>.

**Cadena de Frío:** Mantenimiento de las temperaturas de refrigeración y congelación a lo largo de la cadena alimentaria<sup>9</sup>.

**Contaminación:** introducción o presencia de uno o más contaminantes en los alimentos o en el medio ambiente alimentario<sup>9</sup>.

**Contaminación cruzada:** Ocurre en cualquier etapa de la cadena alimentaria a partir de factores o fuentes externas de contaminación tales como peligros biológicos que provienen de: las manos de los manipuladores, aguas de lavado, superficies y utensilios de contacto, plagas, basura, entre otros<sup>9</sup>.

**Concentración inhibitoria mínima (CIM):** Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación<sup>37</sup>.

**Escala de Mc. Farland:** Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0,5, corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL<sup>37</sup>.

**Factores de riesgo:** Causas que facilitan la contaminación cruzada y/o la proliferación de peligros biológicos en los alimentos, debidas a malas prácticas de manipulación, de higiene y saneamiento, que pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos si no se controlan apropiadamente<sup>9</sup>.

**Intermedio (I):** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Cepas bacterianas que pueden ser inhibidas por concentraciones del antibiótico superiores a las obtenidas con las dosis habituales, siempre y cuando se puedan aumentar las dosis empleadas y/o que el antibiótico se concentre fisiológicamente en el tejido o lugar infectado<sup>37</sup>.

**Manipulador de alimentos:** Es toda persona que tenga contacto directo o indirecto con los alimentos y que se espera por tanto, no represente riesgo de contaminación a los productos alimenticios<sup>56</sup>.

**Multirresistencia antibiótica:** Falta de susceptibilidad a dos o más agentes antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias o grupos<sup>24, 31</sup>.

**Mutación:** Es un error que se produce en el proceso de replicación del ADN, como un cambio en la secuencia de bases cromosómicas<sup>2</sup>.



**Plásmidos:** Son porciones circulares de ADN extracromosómico que puede estar codificado para resistencia a un determinado antibiótico. Pueden ser transferidos entre bacterias del mismo, o diferentes géneros<sup>2</sup>.

**Poliestireno Expandido (EPS):** Es un material plástico espumado utilizado en el sector de la Construcción, principalmente como aislamiento térmico y acústico, en el campo del Envase y Embalaje para diferentes sectores de actividad y en una serie de aplicaciones diversas<sup>57</sup>.

**Resistencia a antibióticos:** El resultado de la adaptación de las bacterias de forma que reducen o eliminan la eficacia de los antibióticos. La resistencia a antibióticos es un tipo de resistencia a los antimicrobianos<sup>31</sup>.

**Resistente (R):** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Cepas bacterianas que no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada<sup>37</sup>.

**Sensible (S):** Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones<sup>37</sup>.

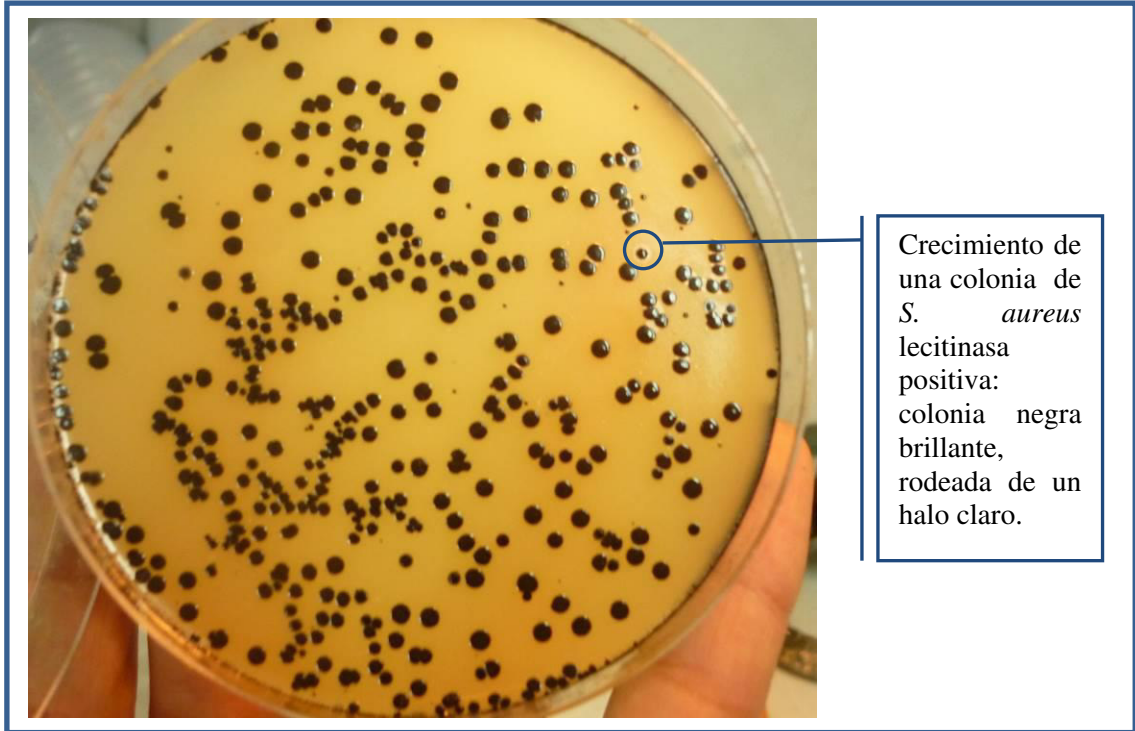
**Transposones:** Son conocidos como genes saltarines. Son cadenas cortas de ADN que saltan de cromosoma a plásmido, en uno u otro sentido, entre plásmidos o entre plásmidos y bacteriófagos<sup>2</sup>.

**Uso inapropiado de antibióticos:** Se define como la prescripción excesiva, infraindicación, dosificación inapropiada, una duración incorrecta del tratamiento o la incorrecta elección de la droga por el organismo pertinente<sup>19, 26</sup>.

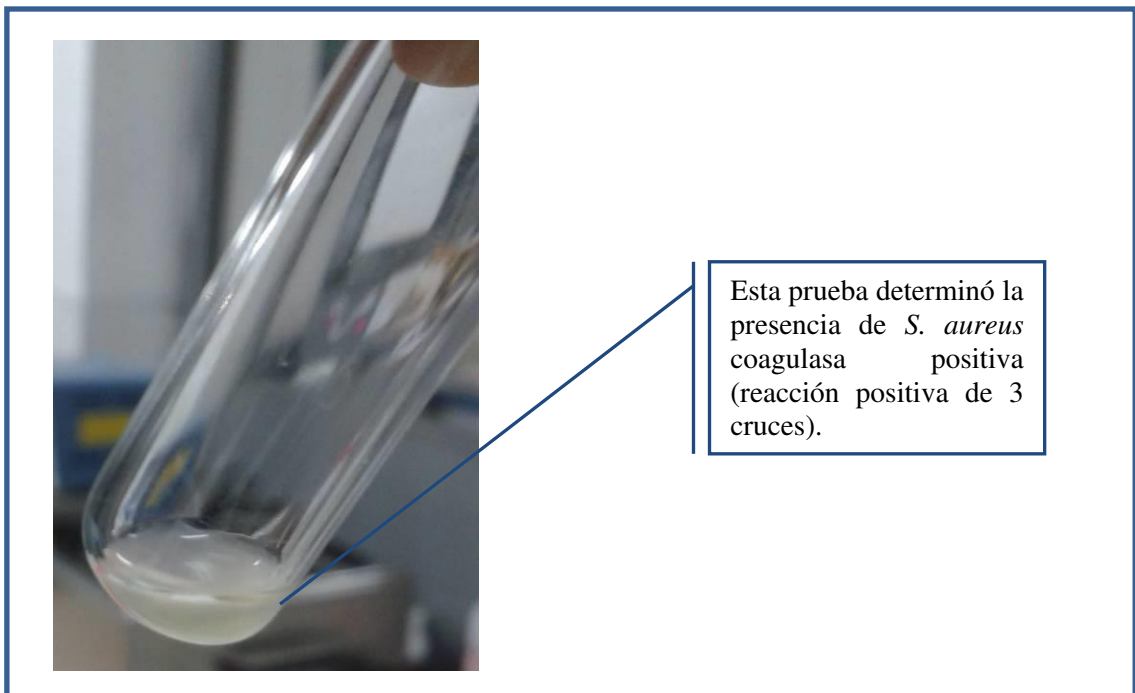
## ANEXO N° 5

### Fotos de las pruebas realizadas

#### Aislamiento y Crecimiento en Agar Baird Parker



#### Prueba de Coagulasa

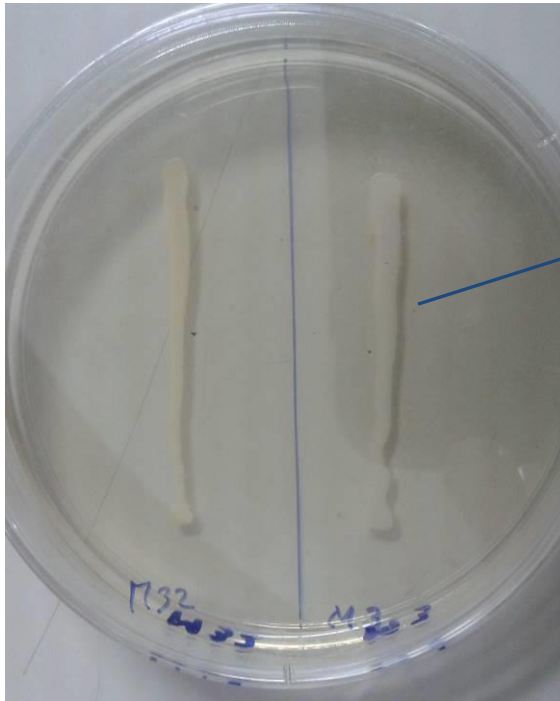


### Prueba en Agar Manitol Salado



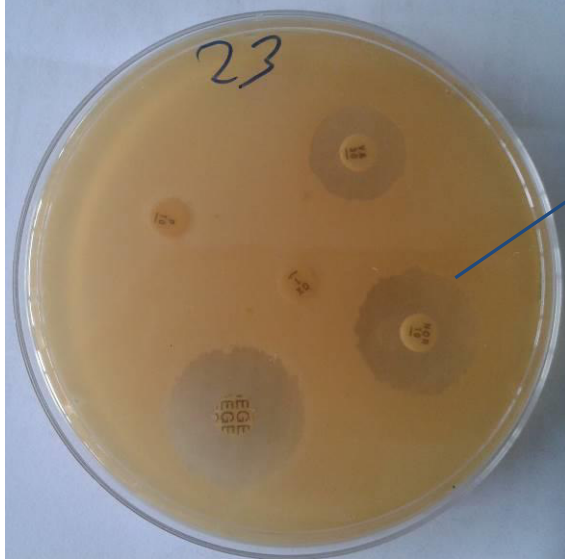
Esta prueba muestra colonias amarillas rodeadas de una zona del mismo color, que indica la fermentación del manitol por *S. aureus*

### Prueba en Agar DNA



Esta prueba muestra un medio opaco debido a la precipitación del ADN por efecto del HCl y un halo claro alrededor de la colonia que corresponde a la degradación del ADN por el *S. aureus*.

**Prueba de sensibilidad por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer**



Esta prueba determinó la susceptibilidad de *S. aureus* coagulasa positiva a los antibióticos mediante la medición del diámetro del halo formado.